

Die Beteiligung von Vitamin B₁₂-Coenzym
an der Umlagerung von Methylmalonyl-CoA
in Succinyl-CoA

Versuche zum Stoffwechsel der Propionsäure
in Propionibakterium shermanii

von

PETER OVERATH

1961



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555223_0036

Die Beteiligung von Vitamin B₁₂-Coenzym an
der Umlagerung von Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA

(Versuche zum Stoffwechsel der Propionsäure in
Propionibakterium shermanii)

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Peter Overath
aus
München
Mai 1961

Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 7. 1961

Allen denen in Dankbarkeit
gewidmet,
die mir das Studium ermöglichten



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juli 1959 bis April 1961 am Max Planck-Institut für Zellchemie in München ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. F. L Y N E N

danke ich herzlich für seine Hilfe und das Interesse, das er meiner Arbeit und mir selbst jederzeit entgegenbrachte.

Herrn Dr. E. R. S T A D T M A N danke ich für viele anregende Diskussionen.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die Gewährung eines Stipendiums.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

=====

	Seite
Einführung und Problemstellung	1
Ergebnisse	9
I. Die Darstellung von Methylmalonyl-CoA	9
II. Der Nachweis der Reaktionen, die zum Einbau von ^{14}C -Propionat in Succinat führen	13
1. Der Austausch von ^{14}C -Propionat und Succinat; die Beteiligung von Vitamin B_{12} -Coenzym und Biotin als Cofaktoren	13
2. Methylmalonyl-CoA als Zwischenprodukt des Austausches von ^{14}C -Propionat mit Succinat	18
a) Die Transcarboxylierung von Propionyl-CoA und Methylmalonyl-CoA	20
b) Die Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA	22
3. Die Bedeutung der beschriebenen Reaktionen für die Propionsäurebildung in Propionibakterium shermanii	35
III. Die Anreicherung der Methylmalonyl-CoA-Isomerase und die Eigenschaften des gereinigten Enzyms	38
1. Die Anreicherung des Enzyms	38
2. Die Eigenschaften des gereinigten Enzyms	40
a) Verunreinigung durch andere Enzymaktivitäten	40
b) Der Gehalt an Dimethylbenzimidazol- B_{12} -Coenzym	41

c) Versuche zum Ersatz von Dimethylbenzimidazol- B_{12} -Coenzym durch lichtinaktiviertes Dimethylbenzimidazol- B_{12} -Coenzym und durch Vitamin B_{12} ; die Natur der dem Enzym anhaftenden roten Farbe	43
d) Das Verhalten des Enzyms in der Ultrazentrifuge	46
e) Das elektrophoretische Verhalten des Enzyms	48
f) Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Isomerisierungsreaktion	51
IV. Versuche zum Mechanismus der Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA	56
Experimenteller Teil	67
I. Die verwendeten Substrate und die Beschreibung allgemeiner Methoden	67
II. Die Darstellung von Monothioleestern der Methylmalonsäure	68
1. Methylmalonsäure	68
2. S-Methylmalonyl-N-capryl-cysteamin	69
a) Darstellung	69
b) Eigenschaften	70
3. Methylmalonyl-CoA	76
4. Methylmalonyl-pantethein	77
III. Die Darstellung der radioaktiven Substrate	78
1. 2- ^{14}C -Methylmalonyl-CoA	78
2. 1,4- ^{14}C -Succinyl-CoA	80
IV. Die Darstellung der Enzyme aus Propionsäurebakterien	82

	Seite
1. Die Züchtung von <i>Propionibakterium shermanii</i>	82
2. Die Anreicherung des Enzymsystems zum Einbau von ^{14}C -Propionat in Succinat	83
3. Enzymtest und Anreicherung der Methylmalonyl-CoA-Isomerase	85
V. Versuche mit gereinigter Methylmalonyl-CoA-Isomerase	92
1. Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten	92
2. Die Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA in tritiiertem Wasser	95
3. Der Versuch zum Nachweis von Acrylsäure als Zwischenprodukt der Isomerisierungsreaktion	97
Zusammenfassung	98
Literaturverzeichnis	101

A B K Ü R Z U N G E N

=====

ATP, ADP	Adenosintri- bzw. di-phosphat
AC	Adenin-B ₁₂ -Coenzym
BC	Benzimidazol-B ₁₂ -Coenzym
DMBC	Dimethylbenzimidazol-B ₁₂ - Coenzym
DPN, DPNH ₂	oxydiertes und reduziertes Diphosphopyridinnukleotid
E	Extinktion
ε	molarer Extinktionskoeffizient
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
I.p.M.	Impulse pro Minute
k	Geschwindigkeitskonstante
K	Gleichgewichtskonstante
LiPS ₂	Liponsäure
MG	Molekulargewicht
mu	mμ
ug	μg
uMol	μMol
P _a , P _i	Phosphat
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tris-Puffer	Puffer aus Tris und HCl
U/Min.	Umdrehungen pro Minute

Die objektive Ungewißheit, in der Aneignung der leidenschaftlichsten Innerlichkeit festgehalten, ist die Wahrheit, und zwar die höchste Wahrheit, die es für einen Existierenden gibt.

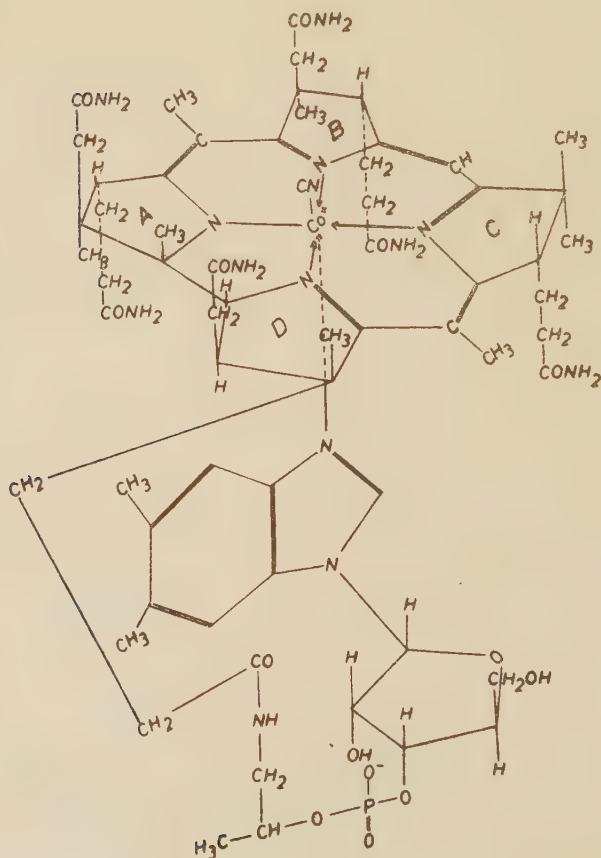
(S.Kierkegaard: Abschließende unwissenschaftliche Nachschrift).

Die geheimnisvolle "Lebenskraft", durch die sich die lebende von der unbelebten Substanz unterscheiden sollte, gehört seit der außerhalb des lebenden Organismus durchgeführten Synthese des Harnstoffs durch WÖHLER im Jahre 1828 ins Reich philosophischer Spekulation. Die Untersuchung der Wirkungsweise aller Stoffe, die mit dem Leben verbunden sind, wurde zur Aufgabe der Biochemie.

Neben der Vielfalt von Verbindungen, die der menschliche Körper aus den Hauptnahrungsmitteln Eiweiß, Fett und Kohlenhydrat zur Gewinnung von Energie zersetzt und zur Bildung neuer Substanz synthetisiert, gibt es nur wenige lebensnotwendige Stoffe, die er nicht selbst aufbauen kann. Charakteristisch für diese Vitamine genannten Wirkstoffe ist, daß sie nur in sehr kleinen Mengen benötigt werden. Man vermutete daher, daß Vitamine im Stoffwechsel eine katalytische Funktion besäßen. Die Forschungen der letzten 30 Jahre haben diese Annahme bestätigt. Man weiß heute von vielen Vitaminen wie Thiamin, Pyridoxin, Nicotinsäureamid, Biotin u.a., daß sie zum Aufbau der Wirkungsgruppen von Enzymen dienen.

Zu den wasserlöslichen Vitaminen, deren Funktion bis vor kurzem völlig unbekannt war, gehört das Vitamin B₁₂, das amerikanische und englische Forscher^{1,2)} im Jahre 1948 aus Leber isolierten. Vitamin B₁₂ ist einer

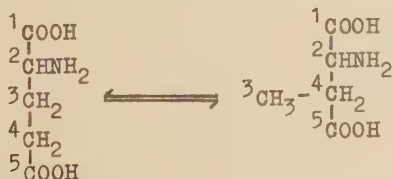
der wirksamsten Stoffe überhaupt. Bei der Behandlung der perniziösen Anämie, dem charakteristischen Krankheitsbild bei Vitamin B₁₂-Mangel, genügen schon wenige µg, um eine starke Reaktion im Knochenmark des Patienten hervorzurufen. Die Aufklärung der Struktur erwies sich als überaus schwierig. Schließlich ergab sich im Jahr 1955 durch Untersuchungen von HODGKIN et al.^{3,4)} und SMITH und Mitarb.⁵⁾ folgendes Formelbild⁶⁾:



Die Struktur des Vitamins gliedert sich in einen Porphyrin- und einen Nucleotidteil. Das hochsubstituierte und teilweise hydrierte Tetrapyrrolringsystem des Porphyrinteils enthält in der Mitte ein komplex gebundenes 3-wertiges Kobalt. Der Nucleotidteil setzt sich aus einer Base, dem 5,6 Dimethylbenzimidazol, der furanosiden Ribose und einer Phosphatgruppe zusammen. Die Verbindung des Porphyrins mit dem Nucleotid kommt einerseits durch eine Isopropylgruppe, andererseits durch eine koordinative Bindung vom N₃ der Base zum Kobalt zustande. Diese Bindung sowie die 4 N-Atome des Porphyrinringsystems und ein CN⁻-Ion sättigen die 6 koordinativen Valenzen des Kobalts ab.

In den Jahren seit der Aufklärung der Struktur des Vitamins hat man sich in verschiedenen Arbeitskreisen darum bemüht, seinen eigentlichen Wirkort im Stoffwechsel aufzuklären. Die Ergebnisse waren meist so summarischer Natur, daß man daraus eigentlich nur auf die Vielfalt der Prozesse schließen konnte, in die Vitamin B₁₂ direkt oder indirekt eingreifen muß. Hier sei deshalb nur kurz erwähnt, daß man bislang den C₁-Körperstoffwechsel, die Methylgruppensynthese, den Nucleinsäurestoffwechsel, die Sulfhydrylgruppen- und die Proteinsynthese (Zusammenfassung siehe ARNSTEIN⁷⁾) mit Vitamin B₁₂ in Zusammenhang gebracht hat.

Eine neue Ära der Vitamin B₁₂-Forschung begann im Jahre 1958, als BARKER und Mitarb.^{8,9)} über eine Reaktion berichteten, an der ein Vitamin B₁₂-Derivat beteiligt ist. BARKER untersuchte die Dissimilation von Glutaminsäure in Cl. tetanomorphum und konnte zeigen, daß dieser Abbau durch eine Isomerisierung der Glutaminsäure zu Methylasparaginsäure eingeleitet wird.

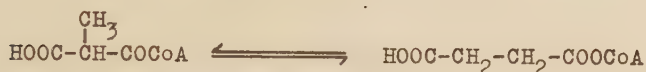


Das diese Reaktion katalysierende Enzym benötigt einen an Kohle adsorbierbaren Cofaktor, der seither Vitamin B₁₂-Coenzym genannt wird. BARKER^{10,11,12)} konnte drei Coenzyme in reiner Form isolieren, die sich voneinander im Nucleotidteil durch Dimethylbenzimidazol, Benzimidazol und Adenin als Base unterscheiden. Im Gegensatz zum Vitamin B₁₂ enthalten die Coenzyme ein Adeninmolekül, das in koordinativer Bindung an das Kobalt gebunden ist und das CN⁻-Ion des Vitamins ersetzt. Dieses Adenin trägt noch einen zuckerartigen Substituenten, der in seiner Struktur noch nicht bekannt ist. Die B₁₂-Coenzyme werden sowohl durch CN⁻-Ionen als auch durch Licht inaktiviert; dabei wird das koordinativ gebundene Adenin abgespalten.

Das bislang am besten untersuchte Adenin-B₁₂-Coenzym wird durch Licht in Adenylcobamidhydroxyd und mindestens zwei ungefärbte Adeninderivate gespalten. Bei der Reaktion mit Cyanid entsteht Pseudovitamin B₁₂⁻ und Adenin. Besonders interessant ist es schließlich, daß das Kobalt in den Coenzymen 2-wertig^{13,14)} und nicht wie im Vitamin B₁₂ dreiwertig ist. Da bestimmte Bakterien besonders hohe Konzentrationen an Vitamin B₁₂-Coenzymen enthalten, wurden diese zunächst von BARKER zur Isolierung herangezogen. Inzwischen konnte er¹⁵⁾ jedoch nachweisen, daß auch im tierischen Organismus und im Menschen der größte Teil aller darin vorkommenden Cobalamine als Coenzyme vorliegen. Damit dürfte kein Zweifel mehr daran bestehen, daß Vitamin B₁₂ selbst als Coenzym bei enzymatischen Reaktionen keine Bedeutung hat.

Als die hier vorliegende Arbeit begonnen wurde, war über eine Beteiligung von Vitamin B₁₂-Coenzymen an anderen Reaktionen als der von BARKER gefundenen Isomerisierungsreaktion nichts bekannt. Erst eine Veröffentlichung von SMITH und MONTY¹⁶⁾ zeigte, daß Vitamin B₁₂ im Propionsäurestoffwechsel eine Rolle spielen könnte. Diese Autoren wiesen nach, daß in der Leber Vitamin B₁₂-arm ernähr-

ter Ratten die Aktivität zur Umwandlung von Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA



stark erniedrigt ist. Die Untersuchungen LARDY's¹⁷⁾ und OCHOA's u. Mitarb.^{18,19,20)} hatten ergeben, daß diese Reaktion im Säugetierorganismus dazu dient, das beim Abbau ungeradzahligter Fettsäuren gebildete Propionyl-CoA in den Citronensäurecyclus einzuschleusen. Propionyl-CoA wird dabei zunächst mit ATP und CO₂ carboxyliert



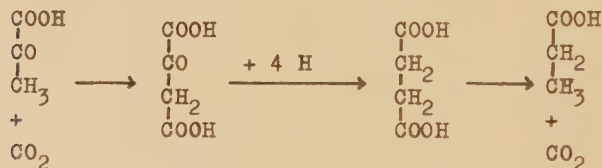
und das gebildete CoA-Derivat der Isobernsteinsäure isomerisiert sich zu Succinyl-CoA. Bei Versuchen mit Biotin-arm ernährten Ratten hatte LARDY²¹⁾ gefunden, daß die Aktivität zur Carboxylierung von Propionat dort niedriger als in der Leber normaler Tiere ist. Daraus konnte man schließen, daß auch bei dieser Reaktion das von LYNEN u. Mitarb.²²⁾ bei der Carboxylierung von β -Methylcrotonyl-CoA zu β -Methylglutaconyl-CoA entdeckte CO₂-Biotin beteiligt ist.

Aus der Funktion der Enzyme, die zum Abbau von Propionsäure führen, geht hervor, daß diese Fermente keine zentrale Stelle im Stoffwechsel der Säugetiere einnehmen. Zum Studium des Propionsäurestoffwechsels sollte sich dagegen ein Organismus besser eignen, in dessen Energiestoffwechsel die Propionsäure eine wesentliche Rolle spielt. Solche Organismen sind die Propionsäurebakterien.

Es ist seit langem bekannt, daß die aus Käse oder Molke isolierten Propionsäurebakterien Milchsäure zu Propionsäure, Essigsäure und CO₂ nach folgender Gleichung vergären:



Schon VAN NIEL²³⁾, dem wir die ersten systematischen Untersuchungen über Propionsäurebakterien verdanken, konnte 1928 zeigen, daß die rechte Seite dieser Gleichung noch durch ein Nebenprodukt, nämlich Bernsteinsäure, ergänzt werden muß. Diese Bernsteinsäurebildung rückte in den folgenden Jahren immer mehr in den Blickpunkt des Interesses, da WOOD und WERKMAN²⁴⁾ nachwiesen, daß bei der Gärung von Glycerin eine dem entstandenen Succinat äquivalente Menge CO₂ aus dem Medium aufgenommen wurde. Intensive Studien von WOOD, WERKMAN und Mitarb.^{25,26)}, von JOHNS^{27,28)} und von DELWICHE²⁹⁾ führten dann zu der Theorie, daß die Bildung der Propionsäure über Succinat erfolge. Die Bernsteinsäure sollte dabei durch Reduktion des aus Pyruvat und CO₂ gebildeten Oxalacetats entstehen:

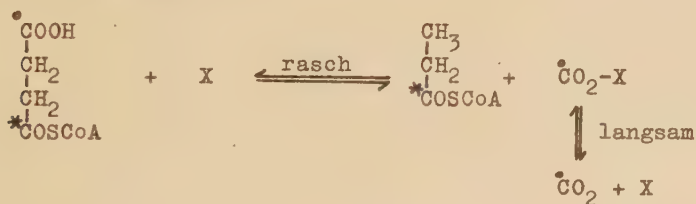


Besonders beweiskräftig für die Annahme von Succinat als symmetrischem Zwischenprodukt war die Tatsache³⁰⁾, daß sowohl 2-¹⁴C- als auch 3-¹⁴C-Lactat im Verlauf der Gärung zu gleichartig an den C-Atomen 2 und 3 markierter Propionsäure führten.

Der letzte Reaktionsschritt, die Decarboxylierung von Succinat zu Propionat, ist formal die Umkehrung der auf S.5 besprochenen Carboxylierung von Propionyl-CoA. Über den näheren Mechanismus dieser Reaktion in Mikroorganismen gab es mehrere Befunde:

WHITELEY³¹⁾ konnte 1953 in zellfreien Extrakten aus *Mikrococcus lacticus* die Aktivierung von Succinat zu Succinyl-CoA und die Decarboxylierung von Succinyl-CoA zu Propionyl-CoA und CO₂ nachweisen. Im Gegensatz zu der

tierischen Propionyl-CoA-Carboxylase (S.5) und der Succinyl-CoA-Decarboxylase aus *Mikrococcus lactyliticus* tritt jedoch in Propionsäurebakterien bei dieser Reaktion kein freies CO_2 auf, d.h. die Bakterien sind nicht in der Lage, Succinyl-CoA unter Bildung von Propionyl-CoA und CO_2 zu spalten. DELWICHE, PHARES und CARSON^{32,33,34}) konnten in Extrakten aus *Propionibacterium pentosaceum* zwar einen Austausch von ^{14}C -Propionat mit Succinat durchführen, doch trat das dabei intermediär gebildete CO_2 in einer gebundenen Form auf, die sich nicht mit freiem CO_2 ins Gleichgewicht setzte. Nennt man den vermuteten CO_2 -Acceptor X, so läßt sich dieser Sachverhalt folgendermaßen veranschaulichen:



Eine Nettosynthese von Propionyl-CoA mit diesem Mechanismus wäre nur dann möglich, wenn für das CO_2 des $\text{CO}_2\text{-X}$ ein geeigneter zweiter Acceptor vorhanden wäre. Die Bildung von freier Propionsäure aus Propionyl-CoA könnte man sich dann leicht mit Hilfe der von WHITELEY³¹⁾ aufgefundenen Transphorasereaktion



erklären. Diese Reaktion würde es ermöglichen, große Mengen Propionat aus Succinat mit katalytischen Mengen an aktivierten Säuren zu bilden.

Der Bedarf an Vitaminen beschränkt sich bei den Propionsäurebakterien im wesentlichen auf Pantothensäure und Biotin³⁵⁾. Den auf S.5 genannten Befunden über den

Einfluß von Vitamin B₁₂ und Biotin auf das tierische Enzymsystem zur Carboxylierung von Propionat entsprechen ähnliche Ergebnisse bei den Propionsäurebakterien. Einmal enthalten sie besonders hohe Konzentrationen an Vitamin-B₁₂-Coenzymen¹¹⁾, zum andern geht bei ihnen bei Biotinmangel die Aktivität zur Decarboxylierung von Succinat zurück (CHAMBERS et al³⁶⁾).

Aus den geschilderten Untersuchungen über den Stoffwechsel der Propionsäurebakterien ergeben sich eine Reihe von Problemen, die Gegenstand vorliegender Arbeit sind. Sie lassen sich in der Frage zusammenfassen: Wie erfolgt die Bildung von Propionsäure aus Succinat in Propionsäurebakterien, und welche Rolle spielen dabei Vitamin-B₁₂ und Biotin?

ER G E B N I S S E

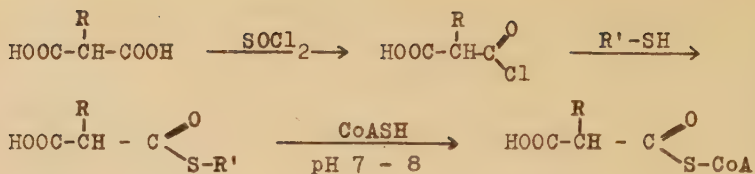
=====

I. Die Darstellung von Methylmalonyl-CoA

In der Einleitung wurde darauf hingewiesen, daß in tierischem Gewebe die Carboxylierung von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA führt, das sich anschließend zu Succinyl-CoA isomerisiert (S.5). Aus Analogiegründen konnte man annehmen, daß auch in Propionsäurebakterien Methylmalonyl-CoA Zwischenprodukt der Decarboxylierung von Succinyl-CoA ist. Deshalb wurde zunächst eine Synthese von Methylmalonyl-CoA ausgearbeitet.

Methylmalonsäure gehört zu den Dicarbonsäuren, die kein inneres Anhydrid bilden. Man kann also hier nicht in einfacher Reaktion des Anhydrids mit Mercaptanen bei schwach alkalischem pH zu Monothioleestern kommen. Andere sich anbietende Methoden zur Darstellung von Thioleestern bringen jedoch die Schwierigkeit mit sich, mono- und disubstituierte Derivate der Dicarbonsäuren voneinander zu trennen. Dies gilt für beide bislang begangenen Wege zur Darstellung von Methylmalonyl-CoA aus Methylmalonsäure: der Methode von FLAVIN et al.¹⁸⁾ über das gemischte Anhydrid und der kürzlich erschienenen Vorschrift von TRAMS et al.³⁷⁾ über das Thiophenylderivat.

Dieses Problem wurde von EGGERER³⁸⁾ für die Synthese von Malonyl-CoA in eleganter Weise gelöst:



R = H bei der Malonsäure

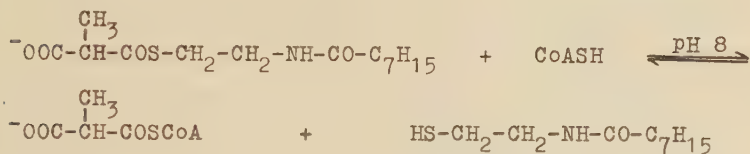
R = CH₃ bei der Methylmalonsäure

R' = N-Capryl-cysteamin

Der erste Schritt der Synthese ist die Chlorierung der Säure mit Thionylchlorid zum Monocarbonsäurechlorid. Dieses wird mit Caprylcysteamin in den Monothiolester übergeführt, aus dem man durch Transacylierung das CoA-Derivat bereiten kann. Diese Darstellungsweise hat den großen Vorzug, daß das zur Acylierung des Coenzym A verwendete Derivat der Säure in reiner Form isoliert werden kann.

Die Darstellung von Methylmalonyl-CoA wurde auf demselben Weg durchgeführt. Man setzt dabei Methylmalonsäure mit Thionylchlorid zu einem Gemisch des Mono- und des Dichlorids um, das direkt mit Caprylcysteamin verrieben wird. Die dabei gebildeten Thiolester lassen sich leicht voneinander trennen: Der Monothiolester besitzt noch eine saure Gruppe und löst sich deshalb im Gegensatz zum Dithiolester in Bicarbonatlösung als Salz. Auf diese Weise konnte reines, kristallisiertes S-Methylmalonyl-N-capryl-cysteamin in 13%iger Ausbeute gewonnen werden. Durch Umesterung kann man daraus dann Methylmalonyl-CoA herstellen. Man setzt dazu einen Überschuß von Methylmalonyl-capryl-cysteamin mit CoASH in wässriger Lösung bei schwach alkalischem pH um. Das Gleichgewicht der beiden Thiolester kann man weitgehend auf die Seite des CoA-Derivats verschieben, wenn man das bei der Reaktion entstehende Caprylcysteamin durch kontinuierliche Extraktion mit Äther entfernt. Bezogen

auf das eingesetzte CoA ist die Ausbeute an Methylmalonyl-CoA quantitativ.



Die großen Erfolge, die LYNEN und seine Schule in der Erforschung des Stoffwechsels aktivierter Carbonsäuren errang, beruhen zu einem wesentlichen Teil auf dem Studium von Modellkörpern. S-Methylmalonyl-N-caprylcysteamin erwies sich daher als sehr nützlich, um die Reaktivität von Methylmalonsäure-thioleestern zu untersuchen. Die Verbindung wird wie alle Thiolester durch Hydroxylamin in die Hydroxamsäure und durch Ammoniak in das Amid übergeführt. Die sich daraus ergebenden Teste zur Bestimmung von Methylmalonsäure-thioleestern sind im experimentellen Teil beschrieben. Die Fig.1 zeigt das für

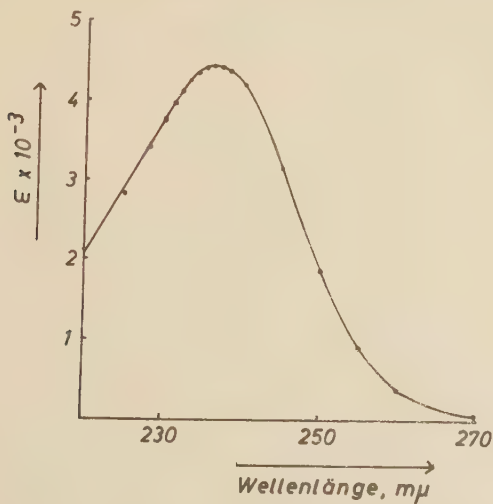


Fig.1: Spektrum von Methylmalonyl-capryl-cysteamin (in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.0). Einzelheiten siehe S.71

Thiolester typische Spektrum der Verbindung. Der molare Extinktionskoeffizient bei 236 mμ beträgt 4450. Bemerkenswert ist jedoch die relativ große Stabilität der Methylmalonsäure-thiolester gegenüber Alkali.

Tabelle 1
Verseifungsgeschwindigkeit von Thioleestern durch Alkali

	k_{15}
S-Malonyl-N-capryl-cysteamin ⁺	2.00
S-Methylmalonyl-N-capryl-cysteamin	0.24
S-Succinyl-N-succinyl-cysteamin ⁺⁺	1.78
S-Glutaryl-N-succinyl-cysteamin ⁺⁺	1.57
S-(β-Methyl-glutaryl)-N-acetyl-cysteamin ⁺⁺⁺	0.65

k_{15} = Geschwindigkeitskonstante bei 15°C
(L x M⁻¹ x Min.⁻¹)

C_{NaOH} = 0.1 M

+) siehe 38)
++) siehe 39)
+++) siehe 40)

Tabelle 1 zeigt die Verseifungsgeschwindigkeit des Methylmalonyl-capryl-cysteamins im Vergleich zu einigen anderen Thioleestern. Aus den Werten für Malonsäure-, Bernsteinsäure- und Glutarsäure-thiolester geht hervor, daß die Monothiolester von Dicarbonsäuren mit wachsendem Abstand der Carboxylgruppen stabiler werden^{39,40}). Diese Tatsache entspricht dem Verhalten der sauren Sauerstoffester der Dicarbonsäuren⁴¹): Auch dort fällt die Verseifungsgeschwindigkeit mit steigender Kettenlänge. Der Vergleich von Glutarsäure- und β-Methyl-glutarsäure-thiolester lehrt, daß die Methylgruppe in β-Stellung zur Thiolestergruppe

die Verseifungsgeschwindigkeit um den Faktor 2.4 herabsetzt. Noch ausgeprägter ist dieser Einfluß der Verzweigung nun, wenn man in α -Stellung zur Thiolestergruppe eine Methylgruppe einführt. Der Methylmalonsäure-thiolester ist 8.3 mal stabiler als der Malonsäure- und 7.4 mal beständiger als der Bernsteinsäure-thiolester. Dieser Effekt steht ebenfalls in Analogie zu dem Verhalten der Sauerstoffester⁴²⁾. Bei der Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit durch die Verzweigung handelt es sich wohl hauptsächlich um einen sterischen Einfluß, da die Methylgruppe den Angriff des OH^- -Ions umso mehr behindert, je näher sie am Thiolestercarboxyl steht.

II. Der Nachweis der Reaktionen, die zum Einbau von ^{14}C -Propionat in Succinat führen

1. Der Austausch von ^{14}C -Propionat und Succinat; die Beteiligung von Vitamin- B_{12} -Coenzym und Biotin als Cofaktoren

Wie einleitend beschrieben, hatten DELWICHE, PHARES und CARSON^{32,33,34)} in Versuchen mit Extrakten aus Propionsäurebakterien gefunden, daß bei der Decarboxylierung von Succinyl-CoA zu Propionyl-CoA ein gebundenes CO_2 auftritt. Ein Argument dafür war der Nachweis eines Austausches von ^{14}C -Propionat und Succinat. Mit dieser Reaktion hat sich Dr. E. R. STADTMAN während seines Aufenthalts im LYNEN'schen Laboratorium eingehend beschäftigt.

Als Test machte STADTMAN von der unterschiedlichen Flüchtigkeit von Propionsäure und Bernsteinsäure Gebrauch. Man dampft dabei einfach die nach der Inkubation

angesäuerte Reaktionslösung ein und mißt die Radioaktivität der nicht flüchtigen Bernsteinsäure.

Die Tabelle 2 zeigt die Bedürfnisse des Systems zum Einbau von ^{14}C -Propionat in Succinat. Als Enzym-

Tabelle 2

Der Einfluß von DMBC auf den Einbau von ^{14}C -Propionat in Succinat nach STADTMAN⁴⁵⁾

			Einbau von ^{14}C - Propionat in Succinat
			I.p.M.
vollständiges System			7170
"	"	- Acetyl-CoA	231
"	"	- Succinat	615
"	"	- Succinat + Methylmalonat	603
"	"	- DMBC	1274
"	"	+ Kochsaft eines Rohextraktes aus Propioni- bakterium sher- manii	6912
"	"	+ Kochsaft - DMBC	6472

Das vollständige System enthielt: K-Succinat pH 6.5, 25 μMol ; K- ^{14}C -Propionat (10 000 I.p.M./ μMol), 10 μMol ; DMBC, 1.6×10^{-7} M; Acetyl-CoA, 0.1 μMol ; K-Maleatpuffer pH 6.5, 10 μMol ; K_2Mg -äthylendiamintetraacetat, 5 μMol ; Cystein, 5 μMol ; Enzym 0.52 mg (siehe S.84). V = 0.5 ml; Inkubationszeit 90 Min. bei 37°C. Man gibt dann 1 Tropfen 0.03%iges Thymolblau zu und säuert mit 20%iger HClO_4 gerade so weit an, daß der ausfallende Proteinniederschlag rosa gefärbt ist. Der pH ist dann 2 - 3. Man zentrifugiert das Protein ab, pipettiert einen aliquoten Teil auf ein Aluminiumplättchen und bringt die Lösung 2 x mit je 7 Tropfen 25%iger Propionsäure auf dem Dampfbad (100°C!) zur Trockne. Man bestimmt dann die nicht flüchtige Radioaktivität.

quelle wurde dazu ein Extrakt aus Propionibakterium shermanii verwendet, auf den unten näher eingegangen wird. Das Experiment zeigt, daß der Austausch von ^{14}C -Propionat und Succinat von katalytischen Mengen Acetyl-CoA und einem Cofaktor abhängig ist, der im Kochsaft des rohen Extrakts enthalten ist. Der Kochsaft kann vollständig durch niedrige Konzentrationen von Dimethylbenzimidazol- B_{12} -Coenzym⁺⁾ ersetzt werden. Dieser Versuch sprach also eindeutig dafür, daß ein B_{12} -Coenzym am Austausch von ^{14}C -Propionat und Succinat beteiligt ist. Weiter geht aus Tabelle 2 noch hervor, daß Methylmalonsäure das Succinat nicht zu ersetzen vermag.

Die Versuche wurden mit einem Extrakt aus Propionibakterium shermanii durchgeführt. Der Rohextrakt der Zellen wurde mit Protaminsulfat und Aktivkohle behandelt und anschließend dialysiert. Der Kohleschritt diente dazu, das B_{12} -Coenzym zu entfernen. Mit dieser Methode war ja BARKER (S.3) dem Coenzym erstmals auf die Spur gekommen.

Die Tabelle 3 zeigt, daß durch diese Schritte das System

Tabelle 3

Die Anreicherung des Enzymsystems aus Propionibakterium shermanii zum Einbau von ^{14}C -Propionat in Succinat (168 g feuchte Bakterienmasse, Einzelheiten siehe S.83)

	Protein in mg	I.p.M./ml im Succinat	I.p.M./mg Protein	Ausbeute in %
Rohextrakt	9250	79 500	4760	100
Protamin- sulfat- überstand	4630	54 600	7200	76
Kohle- überstand	1560	25 900	7400	26

Testansätze: K-Succinat pH 6.5, 50 μMol ; 1- ^{14}C -K-Propionat (20 000 I.p.M./ μMol), 5 μMol ; Acetyl-CoA, 0.06 μMol ; K_2 -Mg-äthylendiamin-tetraessigsäure, 10 μMol ; zentrifugierter Kochsaft des Rohextrakts, 0.3 ml; Enzym, 2.5 mg von jeder Fraktion. V = 1.3 ml; Inkubationszeit 90 Min. bei 37°C. Aufarbeitung wie in der Legende zu Tab.2 angegeben.

+) Herrn Dr.H.A.BARKER möchte ich für die Überlassung von DMBC und BC herzlich danken.

zum Einbau von ^{14}C -Propionat in Succinat 1.6-fach angereichert wurde.

Aus Tabelle 4 geht eine weitere wichtige Eigenschaft des Austauschs von ^{14}C -Propionat mit Succinat hervor: Die Reaktion wird durch Avidin gehemmt, sie bleibt jedoch unbeeinflusst, wenn man das Avidin mit einem Überschuß an Biotin vor der Enzymzugabe vorinkubiert. Von der Möglichkeit, die Beteiligung des Biotins bei enzymatischen Reaktionen durch Hemmversuche mit Avidin nachzuweisen, hatten erstmals WESSMANN und WERKMANN⁴⁴⁾ und später

Tabelle 4
Die Hemmbarkeit des Einbaus von ^{14}C -Propionat in Succinat durch Avidin

			Einbau von ^{14}C - Propionat in Succinat
			I.p.M.
vollständiges System			4400
"	"	- DMBC	990
"	"	+ Biotin, 0.1 μMol	4500
"	"	+ Avidin, 0.32 Einh.	370
"	"	+ Avidin, 0.32 Einh. + Biotin, 0.1 μMol (5 Min. bei Zimmer- temp. vorinkubiert)	4900

Das vollständige System enthielt: K-Succinat pH 6.5, 25 μMol ; $1\text{-}^{14}\text{C}$ -K-Propionat (10 000 I.p.M./ μMol), 10 μMol ; K_2Mg -äthylendiamin-tetraacetat, 5 μMol ; Cystein (pH 7.0), 5 μMol ; DMBC, 1.6×10^{-7} M; Acetyl-CoA, 0.027 μMol ; Enzym, 0.52 mg (siehe S. 84). V = 0.5 ml, Inkubationszeit bei 37°C : 80 Min. Die Tests wurden wie in der Fußnote zu Tabelle 2 beschrieben aufgearbeitet.

WAKIL et al.⁴⁵⁾ Gebrauch gemacht. Auch bei der Aufklärung der biochemischen Funktion des Biotins bei der Carboxylierung von β -Methyl-crotonyl-CoA durch LYNEN et al.²²⁾ spielte Avidin als Hemmstoff eine wichtige Rolle. Der Versuch von Tabelle 4 sprach also für die Beteiligung eines Biotinenzym am Austausch von ^{14}C -Propionat mit Succinat.

Auf Grund der geschilderten Befunde konnte man den Einbau von ^{14}C -Propionat in Succinat mit folgendem Mechanismus beschreiben:

- 1) Acetyl-CoA + Succinat $\rightleftharpoons$ Succinyl-CoA + Acetat
- 2) Succinyl-CoA $\xrightleftharpoons{\text{DMBC}}$ Methylmalonyl-CoA
- 3) Methylmalonyl-CoA + Biotin-Enzym $\rightleftharpoons$ CO_2 -Biotin-Enzym + Propionyl-CoA
- 4) Propionyl-CoA + Acetat $\rightleftharpoons$ Acetyl-CoA + Propionat



Die beiden Transphorasereaktionen 1 und 4 waren bereits vorher in Propionsäurebakterien nachgewiesen worden^{32,33,34)}. Sie erklären einmal, wie aus Bernsteinsäure und Propionsäure Succinyl-CoA und Propionyl-CoA entstehen können. Andererseits ermöglichen sie es, mit katalytischen Mengen Acetyl-CoA einen Austausch von ^{14}C -Propionat und Succinat durchzuführen. Die Reaktionen 2 und 3, die Isomerisierung von Succinyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA und die Decarboxylierung von Methylmalonyl-CoA zu Propionyl-CoA und CO_2 -Biotin-Enzym, waren zunächst noch hypothetisch. Mit ihnen konnte man die beschriebenen Experimente jedoch leicht deuten, wenn man der Isomerisierungsreaktion das B_{12} -Coenzym als Cofaktor zuordnete und bei der Transcarboxylase Biotin als Wirkungsgruppe postulierte.

2. Methylmalonyl-CoA als Zwischenprodukt des Austauschs von ^{14}C -Propionat mit Succinat

Der erste Hinweis darauf, daß Methylmalonyl-CoA Zwischenprodukt des Austauschs von ^{14}C -Propionat mit Succinat ist, ergab sich aus der Tatsache, daß Acetyl-CoA in diesem Austausch durch Methylmalonyl-CoA ersetzt werden kann. Dies zeigt Tabelle 5 (siehe S.19).

Die dabei verwendeten Testbedingungen wurden von STADTMAN⁴⁷⁾ als optimal für den Austausch befunden. Der Zusatz von Acetyl-phosphat führt zu einer Stimulierung der Reaktion, weil daraus unter der Wirkung des Enzyms Phosphotransacetylase Coenzym A (entstanden z.B. durch Deacylierung von Succinyl-CoA) wieder in Acetyl-CoA umgewandelt werden kann. Ersetzt man das Acetyl-CoA + Acetyl-phosphat durch katalytische Mengen Methylmalonyl-CoA, so erhält man einen hohen Einbau des ^{14}C -Propionats in das Succinat, der wiederum von DMBC abhängig ist.

Tabelle 5

Ersatz von Acetyl-CoA durch Methylmalonyl-CoA im Test zum Einbau von ^{14}C -Propionat in Succinat

			Einbau von ^{14}C -Propionat in Succinat
			I.p.M.
vollständiges System			9537
"	"	-Enzym	300
"	"	-DMBC	1413
"	"	-Acetyl-phosphat	1737
"	"	-Acetyl-phosphat -DMBC	570
"	"	-Acetyl-phosphat -Acetyl-CoA	687
"	"	-Acetyl-phosphat -Succinat	489
"	"	-Acetyl-phosphat -Acetyl-CoA + Methylmalonyl-CoA (0.03 uMol)	13809
"	"	-Acetyl-phosphat -Acetyl-CoA -DMBC + Methylmalonyl-CoA (0.03 uMol)	2274
"	"	-Acetyl-phosphat -Acetyl-CoA -Succinat + Methylmalonyl-CoA (0.03 uMol)	1002
"	"	-Acetyl-phosphat + Methylmalonyl-CoA (0.03 uMol)	7788

Das vollständige System enthielt: K- β , β -Dimethylglutaratpuffer pH 6.7, 20 uMol; K₂ Mg-äthylendiamintetraessigsäure, 5 uMol; Cystein, 3 uMol; Acetyl-CoA, 0.027 uMol; K-2- ^{14}C -Propionat (40 000 I.p.M./uMol), 15 uMol; Li₂-acetyl-phosphat, 2 uMol; DMBC, 3 x 10⁻⁴ M; K-Succinat pH 6.45, 20 uMol; Enzym (siehe S. 84'), 0.52 mg; V = 0.5 ml; 60 Min. 37°C. Nach der Inkubation wurden 0.05 ml 1 M NaOH zugegeben und zur Verseifung der Thiolester 10 Min. auf 100°C erhitzt. Man neutralisiert mit 0.05 ml 2 M HCl und mißt nach der Behandlung mit 25%iger Propionsäure (siehe Tab.2) in einem aliquoten Teil die nichtflüchtige Radioaktivität.

a) Die Transcarboxylierung von Propionyl-CoA und Methylmalonyl-CoA

Die Reaktion 3 auf S. 17 wurde durch den Austausch von ^{14}C -Propionyl-CoA mit Methylmalonyl-CoA bewiesen. Dieser Teilschritt des Einbaus von ^{14}C -Propionat in Succinat wurde von Dr. H. EGGERER untersucht. Ein typisches Experiment zeigt Tabelle 6. Hierbei wurde ^{14}C -Propionyl-CoA und Methylmalonyl-CoA mit Enzym inkubiert, nach der Reaktion die Thiolester durch Alkali gespalten und die nicht flüchtige Radioaktivität bestimmt.

Tabelle 6

Der Austausch von ^{14}C -Propionyl-CoA und Methylmalonyl-CoA und die Hemmbarkeit der Reaktion durch Avidin, nach EGGERER⁴³⁾

			Einbau von ^{14}C in Methylmalonyl-CoA
			I.p.M.
vollständiges System			6900
"	"	- Methylmalonyl-CoA	0
"	"	+ Avidin, 0.31 Einh.	0
"	"	+ Avidin, 0.31 Einh. + Biotin, 0.1 uMol (5 Min. bei 37°C vor- inkubiert)	7240

Das vollständige System enthielt: K-Maleat-Puffer pH 6.5, 10 uMol; $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Propionyl-CoA (10^6 I.p.M./uMol), 0.07 uMol; Methylmalonyl-CoA, 0.05 uMol; Enzym 0.046 mg (siehe S. 84); V = 0.5 ml. Man inkubiert 30 Min. bei 37°C, gibt dann 1 M NaOH bis zu einer Endkonzentration von 0.1 M zu und erhitzt 10 Min. auf 100°C. Man säuert mit 2 n HCl bis pH 2-3 an, pipettiert einen aliquoten Teil auf ein Plättchen und bringt die Lösung 2 x unter Zusatz von 25%iger Propionsäure zur Trockne. Anschließend bestimmt man die nicht flüchtige Radioaktivität.

Aus Tabelle 6 geht hervor, daß diese Reaktion durch Avidin vollständig unterbunden wird. Wir haben also hier den Biotin-abhängigen Schritt des Einbaus von ^{14}C -Propionat in Succinat vor uns. Methylmalonyl-CoA wird zu Propionyl-CoA und CO_2 -Biotin-Enzym gespalten. Bei Anwesenheit von ^{14}C -Propionyl-CoA führt die Rückreaktion dann zu radioaktivem Methylmalonyl-CoA. Das CO_2 -Biotin-Enzym ist das von DELWICHE et al.^{32,33,34}) postulierte gebundene CO_2 . Eine reversible Dissoziation des CO_2 -Biotin-Enzyms ist nicht möglich, da bei der Spaltung die Energie der Bindung zwischen dem CO_2 und dem Biotin-Enzym verloren geht. DELWICHE et al. konnten daher auch keinen Austausch des gebundenen CO_2 mit dem freien CO_2 feststellen.

Die Transcarboxylierungsreaktion läßt sich auch zur Darstellung von ^{14}C -Methylmalonyl-CoA verwenden. Man inkubiert dabei ^{14}C -Propionyl-CoA mit Methylmalonyl-CoA und Enzym und trennt das entstandene ^{14}C -Methylmalonyl-CoA von restlichem ^{14}C -Propionat durch Papierionophorese ab. Fig.2 zeigt die Aufarbeitung eines solchen Ansatzes. Unten (I) sieht man das eingesetzte ^{14}C -Propionyl-CoA, darüber (II) das Reaktionsgemisch und oben (III und IV) das nach der Elution von II gewonnene ^{14}C -Methylmalonyl-CoA und eine Vergleichsprobe mit authentischem Methylmalonyl-CoA. Die dabei erhaltene spez.Aktivität des ^{14}C -Methylmalonyl-CoA hängt einmal von der spez. Aktivität des eingesetzten ^{14}C -Propionyl-CoA und zum andern von dem Mengenverhältnis Propionyl-CoA/Methylmalonyl-CoA ab.

Fig.2 siehe S.22

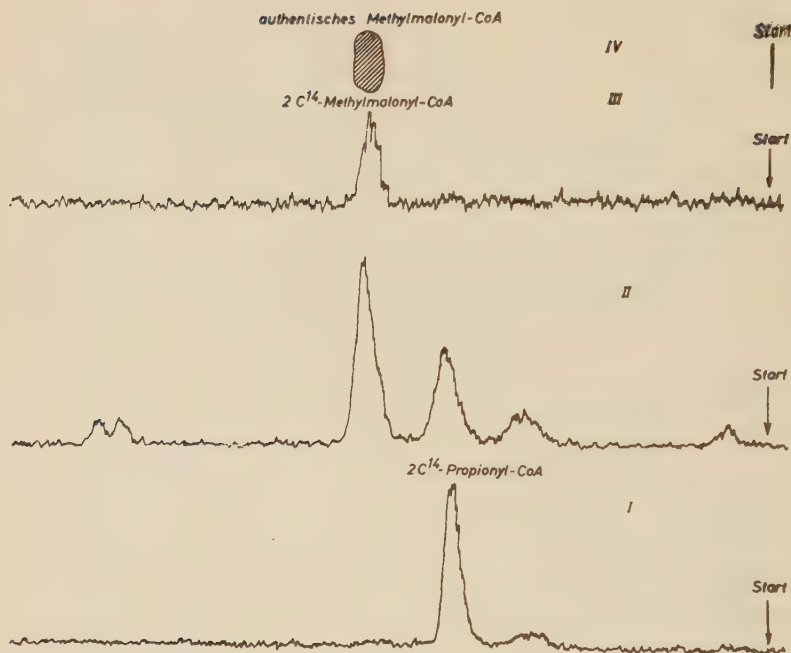


Fig.2: Trennung von ^{14}C -Propionyl-CoA und ^{14}C -Methylmalonyl-CoA durch Papierionophorese. Einzelheiten siehe Text und S. 78

b) Die Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA

Zum Nachweis der Reaktion 2 auf S. 17, der Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA, ergibt sich die Schwierigkeit, zwischen zwei isomeren Verbindungen zu unterscheiden.

Die erste Möglichkeit, diese Reaktion zu testen, ergab sich nach einer Idee EGGERER's aus der unterschiedlichen Stabilität von Methylmalonsäure- bzw. Bernsteinsäure-thioleestern. Diese Versuche sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7

Vergleich der Stabilität von Methylmalonyl-capryl-cysteamin und Disuccinyl-cysteamin

S-Methylmalonyl-N-capryl-cysteamin:

Lösung	Behandlung	E ₂₃₆ ^{mu} ⁺⁾
0.1 M Phosphatpuffer pH 7.0; ca 0.67 μ Mol/ml.	0°C	0.295
	60 Min. 37°C	0.281
	10 Min. 50°C	0.288
	20 Min. 50°C	0.287
	5 Min. 100°C	0.260
0.1 M Phosphatpuffer pH 6.0; ca 1 μ Mol/ml	0°C	0.420
	2 Min. 100°C	0.403
	5 Min. 100°C	0.375

S,N-Disuccinyl-cysteamin:

Lösung	Behandlung	E ₂₃₃ ^{mu} ⁺⁾
0.1 M Phosphatpuffer pH 7.0; ca 1 μ Mol/ml	0°C	0.440
	60 Min. 37°C	0.187
	10 Min. 50°C	0.192
	20 Min. 50°C	0.148
	5 Min. 100°C	0.018
0.1 M Phosphatpuffer pH 6.0; ca 1 μ Mol/ml	0°C	0,386
	2 Min. 100°C	-
	5 Min. 100°C	-

+) Die Lösungen mit den angegebenen Konzentrationen wurden wie beschrieben behandelt, zur Messung der Extinktion wurden sie dann 1:10 verdünnt. Die dabei erhaltenen Werte wurden direkt in Tabelle 7 angegeben.

Hierbei wurde die Beständigkeit der Lösungen von S-Methylmalonyl-N-capryl-cysteamin und von N,S-Disuccinyl-cysteamin in Phosphatpuffern pH 6 und pH 7 durch Messung der Absorptionsbande der Thiolesterbindung verglichen. Die Tabelle 7 zeigt, daß der Bernsteinsäure-thiolester durch 2 - 5 minütiges Erhitzen auf 100°C vollständig gespalten wird, während der Methylmalonsäure-thiolester dabei erhalten bleibt. Zu dem gleichen Ergebnis kommt man, wenn man die Stabilitätsuntersuchung mit der Thiolesterbestimmung als Hydroxamsäure (S. 71 und 80) durchführt.

Hieraus ergab sich ein einfacher Test zur Messung der Isomerisierungsreaktion. Man inkubiert Methylmalonyl-CoA mit Enzym, erhitzt dann die Lösung 2 Min. auf 100°C und bestimmt den verbleibenden Thiolester als Hydroxamsäure (S. 71). Ein solches Experiment ist in Tabelle 8 beschrieben.

Tabelle 8

Der Einfluß von DMBC und von Avidin auf die Umwandlung von Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA

			Abnahme an Methylmalonyl-CoA in uMol
vollständiges System			0.29
"	"	- DMBC	0.06
"	"	+ Avidin, 0.13 Einh.	0.30
"	"	+ Avidin, 0.13 Einh. + Biotin, 0.1 uMol (5 Min.vorinkubiert)	0.28
"	"	- Enzym	0.0

Das vollständige System enthielt: K-Maleat-Puffer pH 6.5, 25 uMol; Methylmalonyl-CoA, 0.66 uMol; DMBC, 1.6×10^{-7} M; Enzym 0.105 mg (siehe S.84); V = 0.5 ml. Die Proben wurden zunächst 30 Min. bei 37°C inkubiert, dann 2 Min. auf 100°C erhitzt und das zurückgebliebene Methylmalonyl-CoA wie auf S. 71 beschrieben als Methylmalonhydroxamsäure bestimmt.

Es geht daraus hervor, daß der Extrakt aus Propionsäurebakterien eine Reaktion katalysiert, die Methylmalonyl-CoA in einen hitzelabilen Thiolester umwandelt. Die Reaktion ist vom Zusatz von DMBC abhängig und wird nicht durch Avidin gehemmt.

Um das aus Methylmalonyl-CoA gebildete Reaktionsprodukt zu bestimmen, wurde auf einen Test zurückgegriffen, mit dem BECK et al.²⁰⁾ die Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA verfolgt hatten. Dieser Test beruht auf der Bestimmung von Succinat mit Succinooxydase. Mit Cytochrom C als Elektronenacceptor kann man die Oxydation des Succinats bei 550 mμ verfolgen. Im Versuch der Tabelle 9 wurde Methylmalonyl-CoA unter ähnlichen Bedingungen wie in Tabelle 8 mit

Tabelle 9

Die Stimulierung der Umlagerung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA durch DMBC: Die enzymatische Bestimmung des Succinats mit Succinooxydase

	Succinat in uMol
vollständiges System	0.1
" " - DMBC	0.01

Das vollständige System enthielt: K-Phosphatpuffer pH 7.0, 25 uMol Methylmalonyl-CoA; 0.66 uMol; DMBC; 1.6×10^{-7} M, Enzym, 0.105 mg (siehe S. 84). V = 0.5 ml; Inkubation 30 Min. bei 37°C. Die Proben wurden danach 3 Min. auf 100°C erhitzt, mit 0.2 ml 2 n HCl angesäuert und 3 x mit 5 ml peroxydfreiem Äther ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden mit 1 g Na₂SO₄ getrocknet, das Trockenmittel dann nochmals mit 5 ml Äther ausgezogen. Die vereinigten Extrakte wurden zur Trockne gebracht und im Rückstand nach der Methode von BECK et al.²⁰⁾ das Succinat bestimmt. Ein Kontrollwert mit gekochtem Enzym wurde berücksichtigt. Zwei Teste mit 0.1 und 0.3 uMol K-Succinat ohne Methylmalonyl-CoA und mit gekochtem Enzym wurden zur Aufstellung einer Eichkurve verwendet.

Enzym inkubiert. Nach der Reaktion wurde zur Hydrolyse des entstandenen Succinyl-CoA 3 Min. auf 100°C erhitzt, und das Succinat nach BECK et al. bestimmt.

Da in Abwesenheit von DMBC nur der zehnte Teil an Succinat im Vergleich zur Probe mit Coenzym gebildet wurde, war dieses Experiment ein weiterer Beweis für den Ablauf der Vitamin B₁₂-Coenzym abhängigen Isomerisierungsreaktion von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA.

Die in Tabelle 8 und 9 beschriebenen Teste zur Messung der Isomerisierungsreaktion eignen sich schlecht zu Routinebestimmungen, z.B. bei einer Enzymanreicherung. Sie benötigen beide relativ große Mengen an Substrat. Die Bestimmung der Bernsteinsäure mit Succinooxydase ist außerdem recht umständlich.

Auf der Suche nach einem einfachen Test wurde zunächst die Möglichkeit untersucht, ob man in dem in Tabelle 8 verwendeten Test das natürliche Substrat Methylmalonyl-CoA durch einen Modellkörper ersetzen kann. Dies ist nicht der Fall. Tabelle 10 zeigt einen Versuch mit Methylmalonyl-pantethein, aus dem hervorgeht, daß dieses Substrat von der Isomerase nicht umgesetzt wird.

Tabelle 10

Versuch zur enzymatischen Umwandlung von Methylmalonyl-pantethein in Succinyl-pantethein

		Methylmalonyl-pantethein in uMol nach der Reaktion
vollständiges System		0.69
"	" -DMBC	0.70
"	" -Enzym	0.68

Das vollständige System enthielt: K-Maleatpuffer pH 6.5, 25 uMol; Methylmalonyl-pantethein, 0.68 uMol; DMBC, 1.6×10^{-4} M; Enzym, 1.2 mg (siehe S. 84); V = 0.5 ml; Inkubation: 60 Min. 37°C. Die Proben wurden dann 2 Min. auf 100°C erhitzt und das Methylmalonyl-pantethein als Methylmalon-hydroxamsäure (S. 71) bestimmt.

Mehr Erfolg für einen Test zur Unterscheidung der isomeren Dicarbonsäuren versprochen Versuche mit Oxydationsmitteln. Wie aus Tabelle 11 hervorgeht, wird ^{14}C -Methylmalonsäure und ^{14}C -Methylmalonyl-CoA durch saures Permanganat bei 80°C weitgehend zerstört, während ^{14}C -Bernsteinsäure stabil gegen dieses Reagenz ist. Bei Durchsicht der Literatur stellte es sich freilich heraus, daß zuvor schon FLAVIN et al.⁴⁶⁾ von dieser Möglichkeit Gebrauch gemacht hatten.

Tabelle 11

Die Stabilität von Methylmalonsäure, Bernsteinsäure und Methylmalonyl-CoA gegen Kaliumpermanganat

	I.p.M.	
	unbehandelt	nach Oxydation mit KMnO_4
1- ^{14}C -Methylmalonsäure ¹⁾	850	66
1,4- ^{14}C -Bernsteinsäure ²⁾	9000	8900
1- ^{14}C -Methylmalonyl-CoA ³⁾	3006	300
2- ^{14}C -Methylmalonyl-CoA ⁴⁾	2575	498

- 1) 0.9 mg (945 I.p.M./mg) + 0.05 ml Eisessig + 0.25 ml 0.1 M KMnO_4 ; V = 0.4 ml; 10 Min. 80°C .
- 2) 0.059 mg (453 000 I.p.M./mg) + 0.05 ml Eisessig + 0.25 ml 0.1 M KMnO_4 ; V = 0.4 ml; 10 Min. 80°C .
- 3) 0.013 μMol (230 000 I.p.M./ μMol) + 0.05 ml Eisessig + 0.1 ml 0.1 M KMnO_4 ; V = 0.4 ml; 10 Min. 80°C .
- 4) 0.017 μMol (151 000 I.p.M./ μMol) + 0.05 ml Eisessig + 0.1 ml KMnO_4 ; V = 0.4 ml; 10 Min. 80°C .

Auf dieser Tatsache ließ sich ein sehr brauchbarer Test aufbauen, dessen Durchführung im experimentellen Teil ausführlich beschrieben ist. Neben 1- oder 2- ^{14}C -Methylmalonyl-CoA, DMBC und Enzym enthielten die Reaktionsansätze K-Succinat als Puffer, sowie Serumalbumin und Avidin. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch

Erhitzen auf 100°C abgestoppt. Dabei wird das entstandene ^{14}C -Succinyl-CoA zu ^{14}C -Succinat und CoA gespalten. Nach Zugabe von Eisessig und K-Permanganat wurden die Proben 10 Min. auf 80°C erhitzt und die permanganat-stabile Radioaktivität bestimmt.

Succinat als Puffer war aus zwei Gründen besonders geeignet. Einmal verdünnt die Bernsteinsäure das bei der Reaktion gebildete ^{14}C -Succinat, andererseits verbraucht sie bei der Oxydation kein Permanganat. Fig. 3 zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Succinatkonzentration. Die Kurve hat ein Maximum beim Zusatz von 20 μMol Succinat, was einer Konzentration von $8 \times 10^{-2}\text{M}$ entspricht.

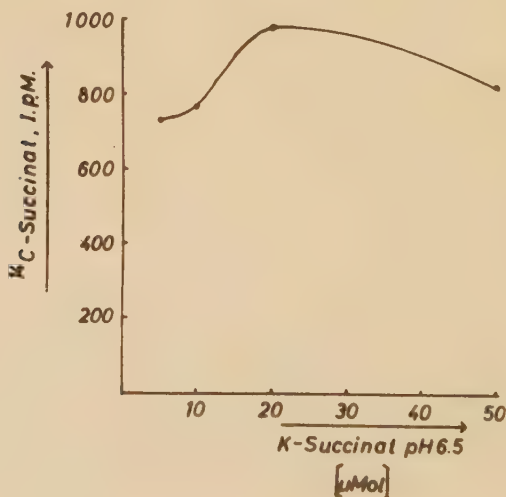


Fig.3: Einfluß des als Puffer verwendeten Succinats auf die Umwandlung von Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA

Testansätze: K-Succinatpuffer pH 6.5; $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Methylmalonyl-CoA (230 000 i.p.m./ μMol), 0.013 μMol ; Avidin, 0.065 E.; Serumalbumin, 0.25 mg; DMBC, $1.5 \times 10^{-7}\text{M}$; Enzym $1.4 \times 10^{-3}\text{mg}$ (siehe S.84). $V = 0.25\text{ ml}$, Inkubationszeit: 10 Min. 37°C . Aufarbeitung wie auf S. 85 beschrieben.

In Fig.4 wurde die pH-Abhängigkeit der Reaktion untersucht. Das pH-Optimum liegt bei pH 6.3. Dieser Wert ist nahezu gleich dem pH-Optimum für den Einbau von $^{14}\text{-C}$ -Propionat in Succinat (STADTMAN⁴⁷).

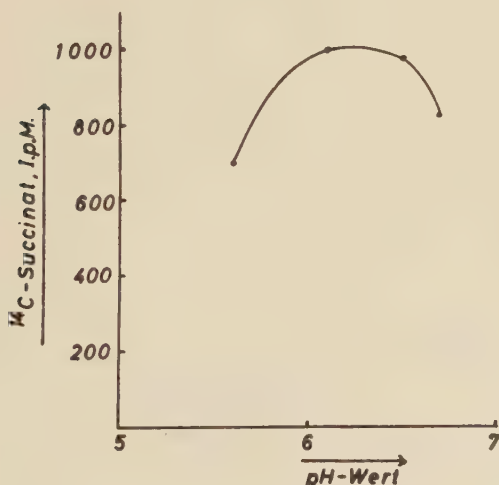


Fig.4: pH-Abhängigkeit der Isomerisierungsreaktion

Testansätze: K-Succinatpuffer (pH nach 12.5-facher Verdünnung 5.6, 6.1, 6.5 und 6.7), 20 μMol ; $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Methylmalonyl-CoA (230 000 I.p.M./ μMol), 0.013 μMol ; Avidin, 0.065 E.; Serumalbumin, 0.25 mg; DMBC, 1.5×10^{-7} M; Enzym (siehe S. 84), 1.4×10^{-5} mg. V = 0.25 ml, Inkubationszeit 10 Min. 37°C . Aufarbeitung wie auf S.85 beschrieben.

Die Fig.5 (siehe S.30) zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom Substrat $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Methylmalonyl-CoA. Normalerweise wurden zum Test 0.017 μMol

Methylmalonyl-CoA verwendet. Dies entspricht einer Konzentration im Test von 6.8×10^{-5} M.

Wie aus Fig. 5 hervorgeht, reicht diese Konzentration nicht aus, um das Enzym mit Substrat zu sättigen.

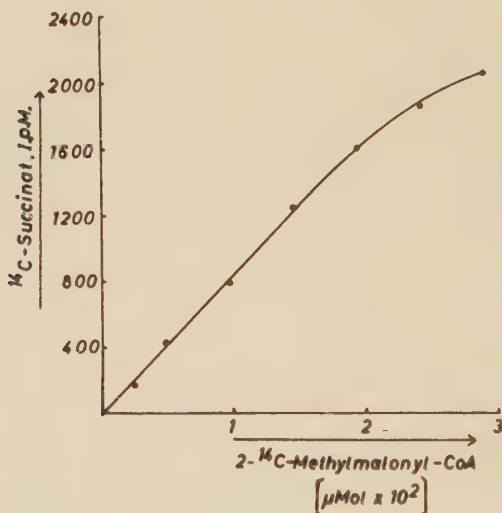


Fig.5: Substratabhängigkeit von Methylmalonyl-CoA im Isomerasetest

Testansätze: K-Succinatpuffer pH 6.25, 20 μMol ; Rinderserumalbumin, 0.25 mg; Avidin 0.07 E.; DMBC, 3×10^{-7} M; Enzym (siehe S. 84), 2.1×10^{-3} mg; 2-¹⁴C-Methylmalonyl-CoA (276 000 I.p.M./ μMol); V = 0.25 ml, Inkubationszeit: 10 Min. bei 37 °C. Aufarbeitung ansonsten wie auf S. 85 beschrieben

Auf S.27 wurde erwähnt, daß dem Test Avidin und Serumalbumin zugesetzt wurden. Das Avidin diente dazu, die Methylmalonyl-CoA/Propionyl-CoA-Transcarboxylase zu hemmen. Außerdem schützt das Avidin als Protein das Enzym. Aus dem gleichen Grund wurde Serumalbumin zugegeben.

Die Fig.6 und 7 (siehe S.31) zeigen die Abhängigkeit

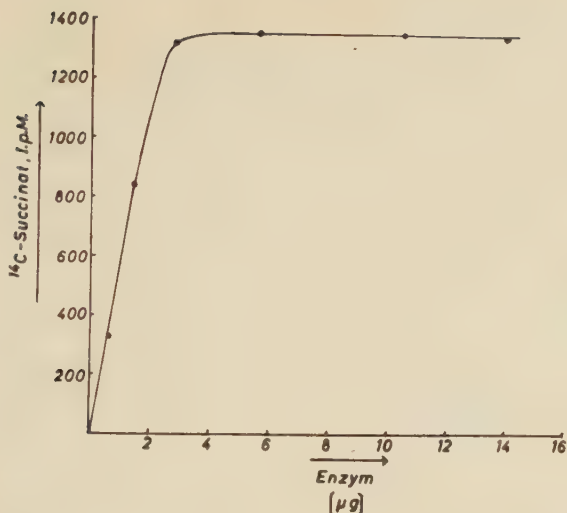


Fig. 6: Enzymabhängigkeit der Isomerisierungsreaktion

Testansatz: K-Succinat pH 6.25, 20 uMol; 1-¹⁴C-Methylmalonyl-CoA (166 000 I.p.M./uMol), 0.017 uMol; Avidin, 0.065 E.; Serumalbumin, 0.25 mg; DMBC, 1.5×10^{-7} M; Enzym (siehe S. 84). V = 0.25 ml 10 Min. 37°C. Aufarbeitung wie auf S. 85 beschrieben.

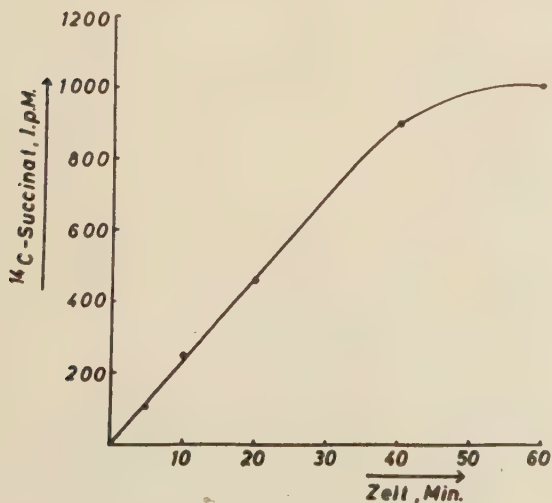


Fig. 7: Kinetik der Isomerisierungsreaktion

Testansätze: wie in der Legende zu Tabelle 6 beschrieben, mit 0.7 µg Enzym

der Isomerisierungsreaktion von der Enzymmenge und von der Zeit. Es sei schon hier darauf hingewiesen, daß sich ^{14}C -Methylmalonyl-CoA offensichtlich nicht quantitativ in ^{14}C -Succinyl-CoA umwandeln läßt. Darauf wird auf S. 51 näher eingegangen.

Besonders schön ließ sich mit dem "Oxydationstest" auch die Abhängigkeit der Isomerisierungsreaktion von dem B_{12} -Coenzym untersuchen (Fig. 8, 9 und 10). In den bislang beschriebenen Experimenten (Tab. 2, 8, 9) stieg die Reaktionsgeschwindigkeit durch den Zusatz von DMBC auf das 6-10fache. Diejenige Aktivität, die ohne den Zusatz von DMBC noch nachweisbar war, wurde durch Coenzym hervorgerufen, das dem Enzym noch anhaftete. Der "Oxydationstest" war nun wesentlich empfindlicher als die anderen

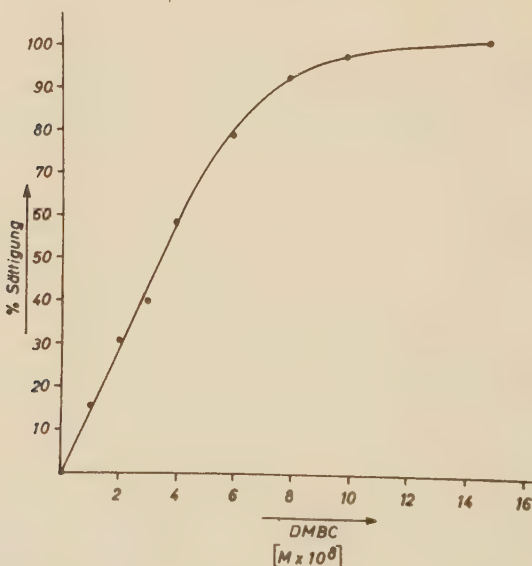


Fig. 8: Stimulierung der Umlagerung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA durch Dimethylbenzimidazol- B_{12} -Coenzym. Test siehe S. 85 , Enzym siehe S. 84

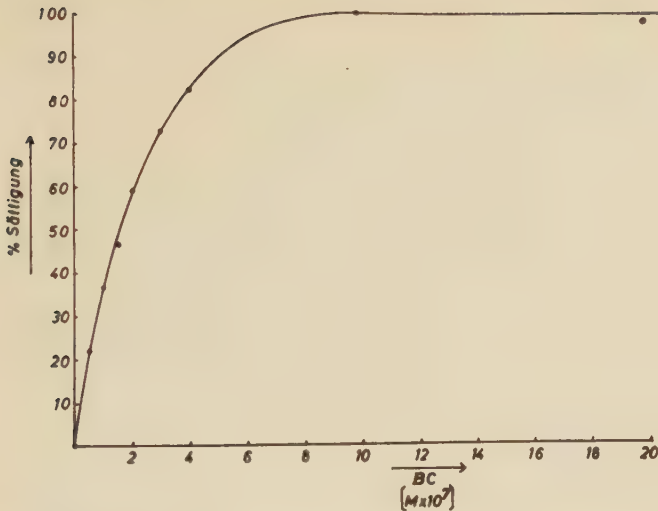


Fig.9: Stimulierung der Umlagerung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA durch Benzimidazol-B₁₂-Coenzym. Test siehe S. 85, Enzym siehe S. 84

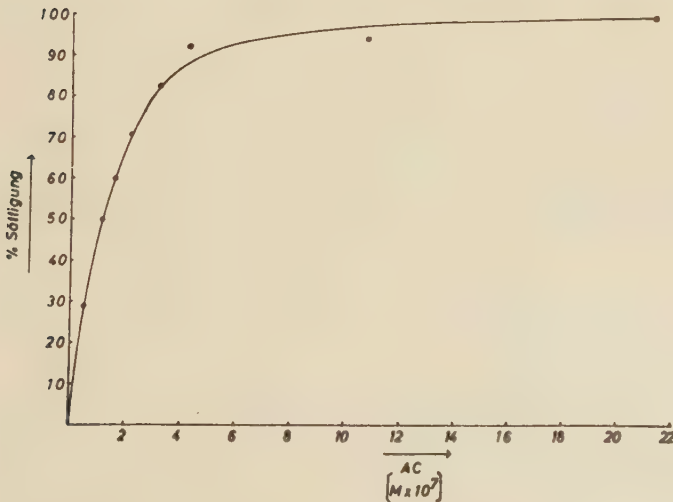


Fig.10: Stimulierung der Umlagerung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA durch Adenin-B₁₂-Coenzym. Test siehe S. 85, Enzym siehe S. 84

Teste, so daß die eingesetzte Enzymmenge etwa um den Faktor 100 erniedrigt werden konnte. Mit dieser kleinen Enzymmenge schleppt man aber so wenig Coenzym in den Test ein, daß ohne die Zugabe von DMBC keine nachweisbare Reaktion mehr stattfindet. Deshalb gehen die Kurven der Fig. 8, 9 und 10 praktisch durch den Ursprung.

In Tabelle 12 sind die Halbsättigungskonstanten für die drei bislang bekannten Coenzyme zusammengestellt. Inzwischen wurde auch in anderen Laboratorien^{48,49,50,51)} die Abhängigkeit der Isomerisierungsreaktion von Vitamin-B₁₂-Coenzym nachgewiesen. In Tabelle 12 sind daher noch Werte von LENGYEL et al.⁵⁰⁾ angegeben. Es ist verständlich, daß das Dimethylbenzimidazol-B₁₂-Coenzym die größte Affinität zur Isomerase besitzt, kommt doch dieses Derivat in *Propionibakterium shermanii* in besonders hoher Konzentration vor¹¹⁾. Das Adeninderivat andererseits zeigt die kleinste Halbsättigungskonstante.

Tabelle 12
Die Halbsättigungskonstanten der B₁₂-Coenzyme

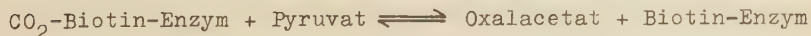
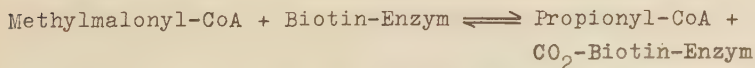
	Methylmalonyl-CoA-Isomerase aus P.shermanii			Niere ⁵⁰⁾
DMBC	3.5 x 10 ⁻⁸	(2.4 x 10 ⁻⁸) ⁺		2.1 x 10 ⁻⁸
BC	1.5 x 10 ⁻⁷	(1.3 x 10 ⁻⁷)		2.0 x 10 ⁻⁷
AC	1.1 x 10 ⁻⁷	(1.0 x 10 ⁻⁷)		-

⁺) Die eingeklammerten Werte sind ebenfalls nach ⁵⁰⁾ zitiert

3. Die Bedeutung der beschriebenen Reaktionen für die Propionsäurebildung in Propioni- bakterium shermanii

Zunächst möchte ich die Ergebnisse der bisher beschriebenen Versuche kurz zusammenfassen: An dem Austausch von ^{14}C -Propionat mit Succinat sind ein Biotin-Enzym und ein B_{12} -Coenzym abhängiges Enzym beteiligt. Das Biotin-Enzym katalysiert den Austausch von ^{14}C -Propionyl-CoA und Methylmalonyl-CoA. Das B_{12} -Coenzym ist Cofaktor der Umwandlung von Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA. Der auf S.17 vorgeschlagene Mechanismus zum Austausch von ^{14}C -Propionat mit Succinat ist damit bewiesen.

Auf S.7 wurde darauf hingewiesen, daß es zu einer Nettosynthese von Propionsäure nur dann kommt, wenn das bei der Succinyl-CoA-Decarboxylierung gebildete $\text{CO}_2\text{-X}$ sein CO_2 an einen zweiten Acceptor abgeben kann. Unsere Versuche sprechen eindeutig dafür, daß das $\text{CO}_2\text{-X}$ nicht aus Succinyl-CoA, sondern aus Methylmalonyl-CoA gebildet wird. Inzwischen haben WOOD und Mitarb.^{52,53)} gefunden, daß der zweite Acceptor Pyruvat ist. Propionsäurebakterien können nämlich eine Transcarboxylierung durchführen, bei der Methylmalonyl-CoA mit Pyruvat zu Oxalacetat und Propionyl-CoA umgesetzt wird.



Auch diese Reaktion wird durch Avidin gehemmt. Das dabei beteiligte Enzym ist wahrscheinlich mit der Methylmalonyl-

CoA/Propionyl-CoA-Transcarboxylase identisch.

Die Versuche von WOOD und seiner Schule hatten zu der Theorie geführt (S.6), daß die Propionsäurebildung über Succinat erfolgt. Diese schon länger zurückliegenden Befunde, die oben genannte Transcarboxylierungsreaktion und die eigenen Experimente, ergeben zusammengekommen ein fast vollständiges Bild von den Reaktionen, die in Propionsäurebakterien zur Bildung von Propionsäure aus Pyruvat führen.

Die Fig.11 zeigt unten die Gleichung, nach der die Propionsäurebakterien Pyruvat zu Propionsäure, Essigsäure und CO_2 vergären. Die Kohlenstoffbilanz und die Anzahl der Redoxäquivalente auf den beiden Seiten ist ausgeglichen, wenn 3 Moleküle Pyruvat in 1 Molekel Propionsäure und je zwei Moleküle Acetat und CO_2 umgewandelt werden. Außerdem geht aus der Gleichung hervor, daß die Bakterienzelle in diesem Prozeß 2 Moleküle ATP gewinnt. Die im ATP gespeicherte Energie kann dann bei allen energieverbrauchenden Leistungen der Zelle verwendet werden.

Der obere Teil von Fig. 11 beschreibt den detaillierten Mechanismus der Propionsäurebildung. Die von WOOD und Mitarb. entdeckte Transcarboxylierungsreaktion ermöglicht es, Pyruvat und Methylmalonyl-CoA zu Oxalacetat und Propionyl-CoA umzusetzen. Die Oxalessigsäure wird dann über Äpfelsäure und Fumarsäure zu Bernsteinsäure reduziert (siehe auch S.6). Die Bernsteinsäure geht anschließend durch die auf S. 7 erwähnte Thiophosphatreaktion in Succinyl-CoA über. Dabei bildet sich aus Propionyl-CoA Propionsäure. Zuletzt isomerisiert sich Succinyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA. Der Kreis schließt sich, wenn das Methylmalonyl-CoA sein CO_2 zur Carboxylierung einer neuen Molekel Pyruvat abgibt. Die zur Reduktion der Bernsteinsäure notwendigen Wasserstoffatome entstehen bei der oxydativen Decarboxylierung von 2

Molekeln Pyruvat zu 2 Acetyl-CoA und 2 CO₂. Die Energie der Thiolesterbindung des Acetyl-CoA kann unter Bildung von Essigsäure in ATP umgewandelt werden.

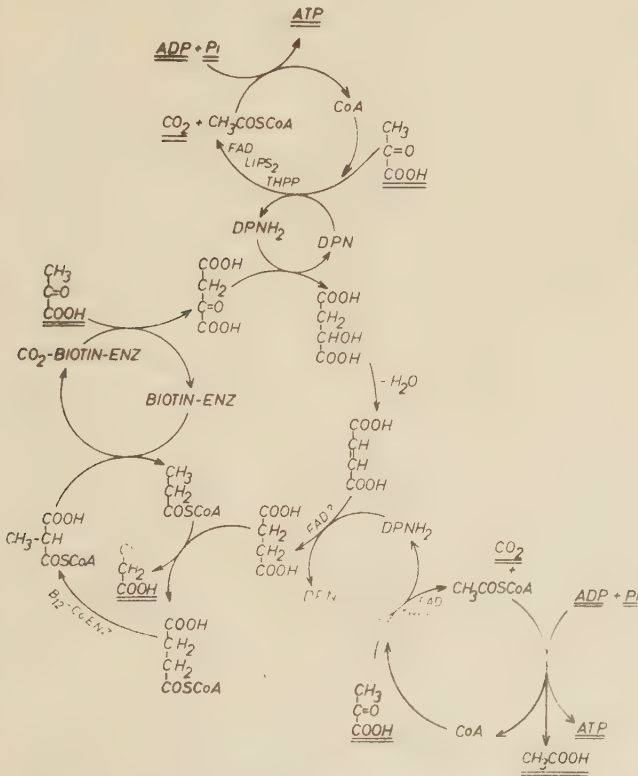


Fig. 11: Der Energiestoffwechsel der Propionsäurebakterien

III. Die Anreicherung der Methylmalonyl-CoA-Isomerase und die Eigenschaften des gereinigten Enzyms

1. Die Anreicherung des Enzyms

Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, daß Propionsäurebakterien ein Enzym enthalten, das Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA isomerisiert. Dieses Enzym wurde aus *Propionibacterium shermanii* 16-fach angereichert. Die Ausbeute an Aktivität im gereinigten Präparat betrug 29% von der des Rohextrakts.

Als Enzymtest wurde die auf S.27 beschriebene Methode verwendet. Als Enzymeinheit wurde diejenige Enzymmenge definiert, die unter den Bedingungen des Tests (S.86) 10^6 I.p.M. aus ^{14}C -Methylmalonyl-CoA in ^{14}C -Succinyl-CoA umzuwandeln vermag. Macht man die sicher nicht ganz zutreffende Annahme (vgl. S. 51 und S. 94), daß das eingesetzte ^{14}C -Methylmalonyl-CoA rein ist, und daß das enzymatisch aktive Diastereomere des ^{14}C -Methylmalonyl-CoA die gesamte Radioaktivität enthält, dann entspricht einer Enzymeinheit unter den Bedingungen des Tests ein Umsatz von 2.97 μMol (siehe auch S. 86).

Die Tabelle 13 zeigt den Anreicherungsang der Isomerase. Die Trockenzellen von *P.shermanii* wurden im Homogenisator nach MERLENSCHLAGER⁵⁴⁾ mit Glasperlen zerschlagen. Der dialysierte Rohextrakt wurde mit Manganchlorid behandelt, um den Hauptteil der Nukleinsäuren zu entfernen. Anschließend wurde das DMBC an Aktivkohle adsorbiert. Nach einer Fraktionierung mit Ammonsulfat wurden restliche Nukleinsäuren mit Protaminsulfat abgetrennt. Einer nochmaligen Fällung mit Ammonsulfat folgte als letzter Schritt eine Chromatographie an Hydroxyl-

apatit⁵⁵). Das Enzym wurde von der Säule als scharfer Gipfel mit 0.1 M Phosphatpuffer eluiert. Der Verlauf der Fraktionierung geht aus Fig.12 (siehe S.40) hervor.

Tabelle 13

Die Anreicherung der Methylmalonyl-CoA-Isomerase aus Trockenzellen von *Propionibakterium shermanii*

Reinigungs- schritt	Volumen in ml	Gesamt- protein in mg	Gesamt- aktivität in Enzym- einh.	spez. Aktiv.	Aus- beute in %
Rohextrakt	575	7650	2390	0.31	100
dialysierter Rohextrakt	575	7410	2520	0.34	105
MnCl ₂ -Schritt	570	(5470)	2200	(0.40)	92
Kohleschritt	475	(3750)	1710	(0.46)	72
1.Ammonsulfat- fällung (58-80%)	34,5	670	930	1.4	39
Protaminsulfat- fällung	45	540	996	1.8	42
2.Ammonsulfat- fällung (55-70%)	9	350	808	2.3	34
Chromatographie an Hydroxylapatit					
Fraktionen:					
81-86	115	115	564	4.9	29
87-92	112	20	124	6.2	

Anmerkung: Wie aus der Anreicherungsvorschrift auf S.87 hervorgeht, wurden von insgesamt 9 ml Enzymlösung, die man nach der 2.Ammonsulfatfällung erhält, nur 8 ml auf die Säule gegeben. Um auf die dort tatsächlich erhaltenen Werte zu kommen, muß man die in Tab.13 bei der Fraktionierung an Hydroxylapatit angegebenen Zahlen für das Volumen, das Gesamtprotein und die Gesamtaktivität mit 8/9 multiplizieren.

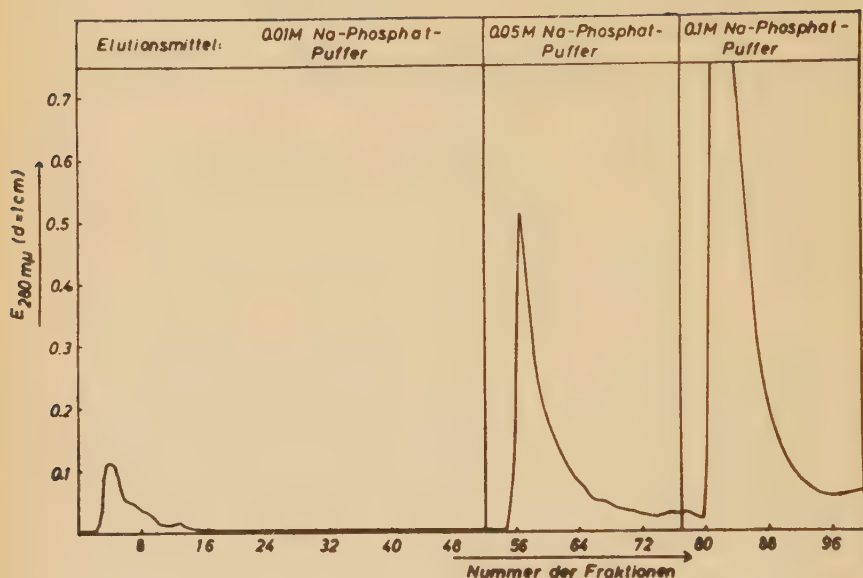


Fig.12: Chromatographie der Methylmalonyl-CoA-Isomerase an Hydroxylapatit

2. Die Eigenschaften des gereinigten Enzyms

a) Verunreinigung durch andere Enzymaktivitäten

Die gereinigte Isomerase katalysiert nicht mehr den Austausch von ^{14}C -Propionat mit Succinat. Die Transcarboxylase, die ^{14}C -Propionyl-CoA und Methylmalonyl-CoA austauscht, wurde ebenfalls weitgehend abgetrennt. In dem in Tab.6 beschriebenen Test zeigte die Isomerase nur 1% der Transcarboxylaseaktivität, die das in Tab.6 verwendete Enzym besitzt.

b) Der Gehalt an DMBC

Auf S. 32 wurde darauf hingewiesen, daß man DMBC nicht quantitativ an Kohle adsorbieren kann. Die Kohleschritte in Tabelle 3 und 13 dürften etwa gleich wirksam sein. Es fragte sich nun, ob auch nach der Reinigung noch B_{12} -Coenzym in der Enzymlösung nachweisbar ist. Die Fig.13 zeigt, daß dies tatsächlich der Fall ist.

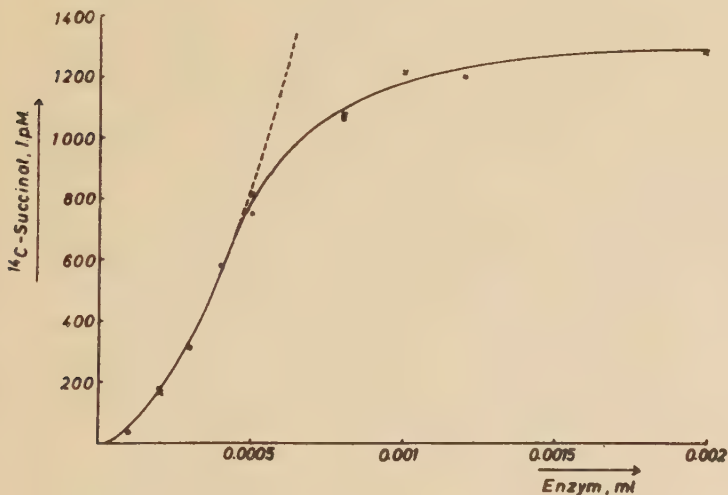


Fig.13: Gereinigte Methylmalonyl-CoA-Isomerase im Test ohne Zusatz von DMBC

Der Test wurde wie auf S. 85 aber ohne Zusatz von DMBC durchgeführt. Als Enzym wurde ein Präparat (nach Chromatographie an Hydroxylapatit) mit einer spez. Akt. von 4,2 und 8.6 mg Protein/ml verwendet.

Die Kurve in Tabelle 13 wurde mit gereinigter Isomerase ohne Zusatz von DMBC durchgeführt. Charakteristisch ist nur der untere, nicht linear ansteigende Teil der Kurve.

Die gestrichelte Linie soll andeuten, wie die Kurve theoretisch weiter verlaufen würde. Im oberen Teil biegt die Kurve ab, weil das Substrat ^{14}C -Methylmalonyl-CoA limitiert. Aus diesem Versuch geht einmal hervor, daß das gereinigte Enzym noch Coenzym enthält, zum andern kann man aus dem nicht linearen Anstieg schließen, daß das B_{12} -Coenzym ein dissoziabiles Coenzym ist.

Das Testvolumen wurde bei den in der Legende zu Tabelle 13 beschriebenen Inkubationsansätzen konstant gehalten, und die Konzentration an Holoferment + Apoenzym wurde erhöht. Die Dissoziation des Holoferments in Apoenzym und Coenzym führt beim Zusatz einer gegebenen Menge an Holoferment + Apoenzym zu einer bestimmten Menge an Holoferment. Verdoppelt man nun bei konstantem Volumen die Menge an Holoferment + Apoenzym, so wird der Anteil an Holoferment und damit die Reaktionsgeschwindigkeit mehr als das doppelte betragen, weil die schon vorhandene Konzentration an Coenzym das Dissoziationsgleichgewicht auf die Seite des Holoferments verschiebt. Würde man das gleiche Experiment mit einem nicht in Coenzym und Apoenzym dissoziierenden Holoferment z.B. mit einem Biotin-Enzym machen, dann würde man eine lineare Abhängigkeit bekommen, d.h. die Kurve würde mit einer normalen Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymmenge identisch sein.

Aus dem unteren Teil der Kurve von Fig.13 läßt sich berechnen, daß die Enzymlösung mit 8.6 mg Protein/ml eine Coenzymkonzentration in der Größenordnung von 10^{-6} M enthält. Diese Tatsache ist bemerkenswert, weil das Enzym ja im Licht angereichert wurde und das Coenzym leicht durch Licht inaktiviert wird. Anscheinend ist das noch am Enzym haftende Coenzym nicht so empfindlich gegen Licht. Es sei noch darauf hingewiesen, daß es STADTMAN⁴⁷⁾ nicht gelang, durch Bestrahlung des kohlebehandelten Extraktes (S.15) den Austausch von ^{14}C -Propionat mit Succinat völlig zu unterbinden.

- c) Versuche zum Ersatz von DMBC durch lichtinaktiviertes DMBC und durch Vitamin B₁₂. Die Natur der dem Enzym anhaftenden roten Farbe.

Sowohl das lichtinaktivierte B₁₂-Coenzym als auch Vitamin B₁₂ vermögen das DMBC im System zum Einbau von ¹⁴C-Propionat in Succinat nicht zu ersetzen (STADTMAN⁴⁷). Zu dem gleichen Ergebnis kommt man in Versuchen mit gereinigter Isomerase.

In Fig.14 Kurve I wurden steigende Mengen lichtinaktiviertes DMBC zu einem mit DMBC gesättigten Enzym zugegeben. Wie man sieht, hemmt das lichtinaktivierte Coenzym nicht. In Kurve II wurde eine bestimmte Menge an DMBC

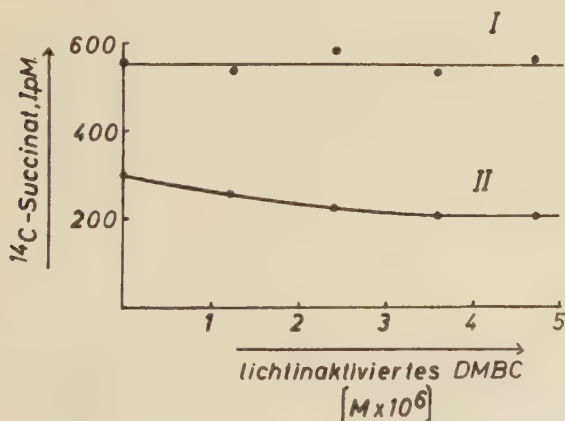


Fig.14: Einfluß des lichtinaktivierten DMBC auf die Isomerisierungsreaktion

I Ansatz: K-Succinatpuffer pH 6.25, 20 uMol; 2-¹⁴C-Methylmalonyl-CoA (167 000 I.p.M./uMol), 0.017 uMol; Serumalbumin, 0.25 mg; Avidin, 0.065 E; DMBC, 4×10^{-7} M; Enzym 5.5×10^{-4} Einh., spez.Akt. 3.2. Test ansonsten wie auf S.85 angegeben.

II Ansatz: Wie bei I beschrieben, hier jedoch DMBC, 4×10^{-8} M. Darstellung des lichtinaktivierten DMBC siehe Lit.9.

zugesezt, die nicht ausreichend ist, um das Enzym zu sättigen. Gibt man wiederum lichtinaktiviertes DMBC zu, so sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit unter den angegebenen Bedingungen um etwa $1/3$. Auch diese 30%ige Hemmung ist jedoch nicht besonders signifikant, wenn man bedenkt, daß die Konzentration des lichtinaktivierten DMBC dabei etwa 100 mal größer ist als die des aktiven DMBC.

Außerdem wurde versucht, ob Vitamin B_{12} das Enzym zu aktivieren vermag. Aus Tabelle 14 geht hervor, daß dies nicht der Fall ist. Die Teste mit und ohne Vitamin B_{12} bei Abwesenheit des DMBC stimmen im Rahmen der Versuchsgenauigkeit überein.

Tabelle 14

Versuch zur Aktivierung des Enzyms durch Vitamin B_{12}

			^{14}C -Succinat
			I.p.M.
vollständiges System			525
"	"	- DMBC	34
"	"	- DMBC + Vitamin B_{12} , $2.7 \times 10^{-5}M$	50

Ansätze wie in der Legende zu Fig.14 beschrieben.
Gereinigte Isomerase 5.25×10^{-4} Einh., Aufarbeitung wie auf S.85 beschrieben.

Die Frage, ob lichtinaktiviertes B_{12} -Coenzym die Isomerase hemmt, war aus folgendem Grund bedeutungsvoll: Es zeigte sich im Verlauf der Anreicherung, daß die aktive Proteinfraction stets von einer roten Farbe begleitet wurde. In Fig.15 sind zum Vergleich das Spektrum des gereinigten Enzyms im sichtbaren Bereich mit dem Spektrum des lichtinaktivierten DMBC verglichen. Die beiden Spektren sind sehr ähnlich. Wenn es sich bei der roten Farbe wirklich um lichtinaktiviertes DMBC handelt, kann man aus Fig.15 (siehe S.45) schließen,

daß die Konzentration bei etwa 10^{-5} M liegt. In Fig.15 wurde das gleiche Enzympräparat wie in Fig.13 verwendet. Die Fermentlösung enthält also lichtinaktiviertes DMBC in einer Konzentration von 10^{-5} M und aktives DMBC in einer Konzentration von 10^{-6} M. Es ist daher verständlich, daß das Spektrum der roten Farbe das des DMBC überdeckt.

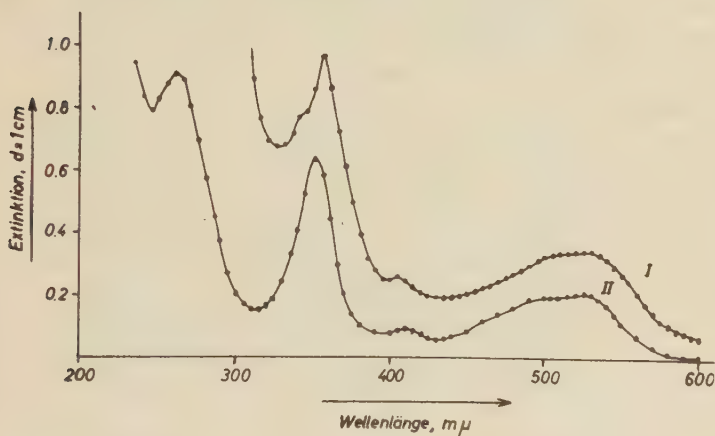


Fig.15: Spektrum der roten Farbe der gereinigten Methylmalonyl-CoA-Isomerase

- I Das Spektrum wurde mit einem Enzympräparat (nach Chromatographie an Hydroxylapatit) mit einer spez.Akt. von 4.2 und 8.6 mg Protein/ml aufgenommen.
- II Spektrum des lichtinaktivierten DMBC (2.96×10^{-5} M). Die Bestrahlung von DMBC wurde, wie bei BARKER⁹⁾ angegeben, durchgeführt.

Versuche, die rote Farbe von dem Protein zu trennen, schlugen bislang fehl. Das gereinigte Enzym ist auch dann rot, wenn man es bis zum Kohleschritt (Tabelle 13) im Dunkeln anreichert. Außerdem wurde mit dem angereicherten Enzym ein weiterer Kohleschritt oder eine saure Ammon-

sulfatfällung (nach ⁵⁰⁾, mit dieser Methode gelang es LENGYEL et al., das DMBC von der Isomerase aus tierischem Gewebe abzuspalten) durchgeführt. Auch dabei blieb die Färbung am Enzym haften.

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung von STJERNHOLM und WOOD⁵¹⁾ wird über die Anreicherung der Isomerase aus *P.shermanii* berichtet. Die Autoren sprechen ebenfalls von einer roten Farbe, die das aktive Protein begleitete. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß diese rote Farbe, wenn sie tatsächlich mit lichtinaktiviertem DMBC identisch ist, eine Bedeutung für die Wirkung des Enzyms oder des Coenzym hat. Da das lichtinaktivierte Coenzym anscheinend recht fest am Protein haftet, andererseits den Test jedoch nicht hemmt, muß man annehmen, daß die Bindung zwischen dieser Verunreinigung und dem Enzym an Stellen des Eiweißmoleküls erfolgt, die nicht für das aktive Coenzym vorgesehen sind.

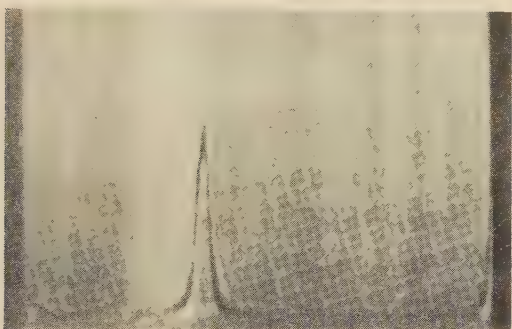
d) Das Verhalten des Enzyms in der Ultrazentrifuge.

Das Verhalten des gereinigten Enzyms in der Ultrazentrifuge⁺⁾ zeigt Fig.16. Wie man sieht, verhielt sich das Protein unter den in der Legende zu Fig.16 (siehe S.47) angegebenen Bedingungen weitgehend einheitlich. Den Verlauf der Sedimentation konnte man sehr gut verfolgen, weil die Lösung oberhalb des zum Boden der Zelle wandernden Gipfels farblos, darunter hingegen rot war. Nach Beendigung des Versuchs konnte man in der Zelle deutlich eine rote Schicht und eine darüberliegende farblose Schicht erkennen. Die beiden Schichten ließen sich durch vorsichtiges Pipettieren trennen. Sowohl die Aktivität als auch das Protein befanden sich fast vollständig in der roten Schicht.

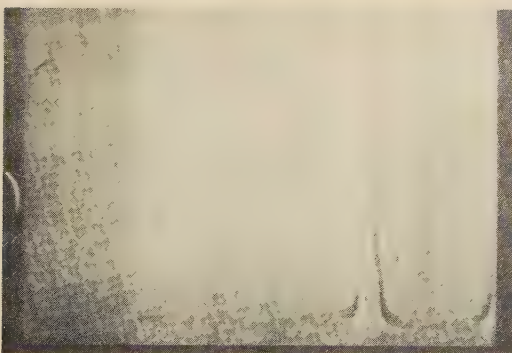
+) Herrn Dr.ZILLIG und Herrn HÖLZL danke ich für die Unterstützung bei diesem Versuch.



I



II



III

Fig.16: Untersuchung der Isomerase in der Ultrazentrifuge

Die Enzymprobe wurde 5 Std. gegen 0.01 M Tris-puffer pH 8.0 dialysiert. Sie enthielt 4.3 mg Protein/ml und hatte eine spez.Akt. von 4.2. Phywe
Ultrazentrifuge: 51000 U/Min., 185 000 x g, Temperatur 7°C. Die Aufnahmen wurden nach 97 (I), 157 (II) 214 (III) Min. gemacht.

e) Das elektrophoretische Verhalten des Enzyms

Anhaltspunkte über die Reinheit eines Enzyms kann man neben der Untersuchung in der Ultrazentrifuge auch aus dem Verhalten im elektrischen Feld gewinnen. Da die unten beschriebene trägerfreie Elektrophorese grössere Proteinmengen benötigt, wurden zunächst Versuche mit Membranfolien unternommen.

Membranfolien⁺) bestehen aus einem porösen Kunststoff, der im Gegensatz zu Papier nur geringe adsorptive Kräfte auf Proteine ausübt. Sie wirken deshalb auch weniger stark denaturierend auf Eiweiß ein. Vorzüglich eignen sie sich z.B. zur Trennung von Serumproteinen.

Einige solche Versuche mit gereinigter Isomerase zeigt Fig.17 (S.49). Die Proteinzonen wurden auf den Elektrophoresestreifen durch Anfärben mit Amidoschwarz kenntlich gemacht. Wie man sieht, wanderte das Protein bei allen verwendeten pH-Werten zur Anode. Auf Streifen I sieht man einen kräftigen Fleck und zwei schwach gefärbte rascher wandernde Zonen. Streifen II zeigt das gleiche nach längerer Versuchsdauer und bei dementsprechend besserer Trennung. Die übrigen Streifen ergeben im wesentlichen das gleiche Bild. Auf Streifen V (pH 4.8) wanderte die kräftige Zone nur noch sehr wenig. Bei diesem pH-Wert ist man also entweder dem isoelektrischen Punkt sehr nahe oder das Enzym ist bereits denaturiert. Die dem Enzym anhaftende rote Farbe wanderte stets an die gleichen Stellen, wo sich nach dem Anfärben der Hauptteil des Proteins befand. Ein Versuch, die Zonen nach der Elektrophorese (in 0.05 M K-Phosphatpuffer pH 7.6) zu eluieren, ergab, daß der kräftige, relativ langsam wandernde Fleck fast die gesamte noch nachweisbare Aktivität enthielt. Man kann also aus diesen Versuchen folgern, daß unter den

⁺) Bezogen von der Firma Schleicher & Schüll, Dassel/
Kr.Einbeck

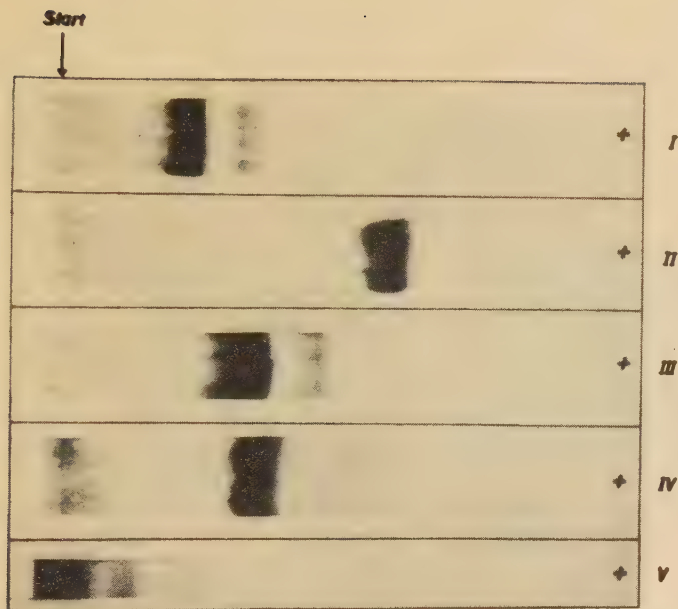


Fig.17: Elektrophoretisches Verhalten der Isomerase

Die Membranfolien (20 x 4 cm) wurden mit Puffer getränkt und vorsichtig auf die Glasplatte des Pherographen (siehe S. 68) gepreßt. Man trinkt ein kleines Stück der Folie (0.4 x 3.5 cm) mit 0.025 ml Enzym (8.6 mg Protein/ml, spez.Akt. 4.2) und legt dieses auf den Elektrophoresestreifen. Dann schaltet man den Strom ein. Das Protein wandert fast quantitativ aus dem aufgelegten Stück Folie heraus. Nach der Elektrophorese trocknet man den Streifen und färbt das Protein mit Amidoschwarz an (Lit.56,57). Dann streicht man die Folie auf eine Glasplatte, besprüht mit Eisessig und trocknet bei 100°C. Bei dieser Operation wird die Folie durchsichtig.

- I Veronal-Acetat-Puffer pH 8.6 nach Lit.58 nur 1:1 mit H₂O verdünnt, Laufzeit 2 Std., ca. 17 V/cm.
- II wie I nur 4 Std. und ca. 15 V/cm.
- III 0.05 M K-Phosphatpuffer pH 7.6, 100 Min., ca 15 V/cm.
- IV Mischung aus 0.05 M Tris und 0.05 M Bernsteinsäure pH 6.5, 3 Std., ca 17 V/cm.
- V Mischung aus 0.05 M Tris und 0.05 M Bernsteinsäure pH 4.8, 2 Std., ca 17 V/cm.

gewählten Bedingungen mindestens 80% des Proteins zusammen mit der Isomeraseaktivität wandern.

Um die Versuche mit Membranfolien zu untermauern, wurde bei pH 7.8 noch ein Experiment mit einer trägerfreien Elektrophoreseapparatur (Gerät der Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, Connecticut, Modell 38 A) gemacht. Wie aus Fig.18 ersichtlich ist, verhielt sich die Iso-

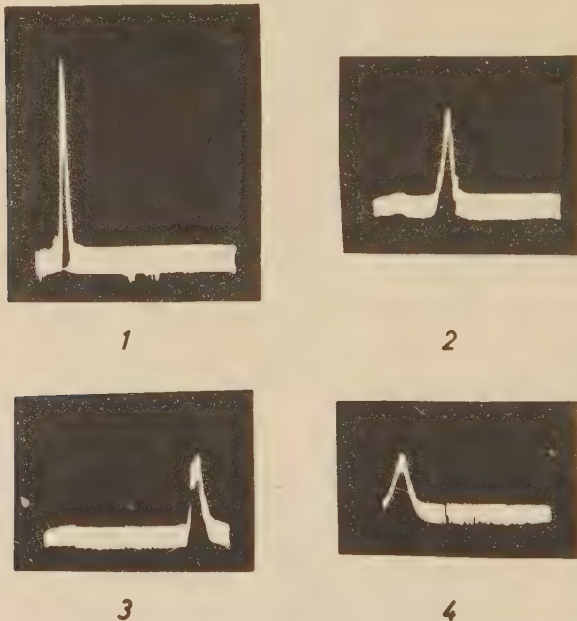


Fig.18: Trägerfreie Elektrophorese

Isomerasepräparat: spez.Akt. 2.9, 5.16 mg Protein/ml, über Nacht dialysiert gegen den zur Elektrophorese verwendeten Puffer.
Puffer: $2.3 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, $68.3 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ und 87.8 g NaCl auf $10 \text{ l H}_2\text{O}$ aufgefüllt, pH 7.8.
Temperatur 10°C , Spannung 150 V, Stromstärke 26 mA.

Aufnahmen: 1 zu Beginn der Elektrophorese
2 nach 47 Min.
3 nach 120 Min.
4 nach 240 Min. (nach 126 Min. wurde die Richtung des Stroms umgekehrt).

merase auch hier einheitlich. Die das Enzym verunreinigende rote Farbe verschob sich mit der gleichen Geschwindigkeit wie die durch den ausgeprägten Gipfel angezeigte Grenzschicht zwischen Proteinklösung und darüber geschichtetem Puffer.

f) Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Isomerisierungsreaktion

Versuche zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA

$$K = \frac{[\text{Methylmalonyl-CoA}]}{[\text{Succinyl-CoA}]}$$

waren nur teilweise erfolgreich. Das Problem einer Gleichgewichtsbestimmung kann man nur dann als gelöst betrachten, wenn man von beiden Seiten der Reaktionsgleichung zu demselben Wert kommt.

Führt man Methylmalonsäure in Methylmalonyl-CoA über, so entsteht ein neues Asymmetriezentrum am tertiären Kohlenstoff der Methylmalonyl-Gruppe. Man erhält also ein Gemisch von zwei Diastereomeren, die im allgemeinen in etwa gleicher Menge vorliegen, und von denen nur der eine Teil enzymatisch aktiv ist. Man sollte daher erwarten, daß synthetisches Methylmalonyl-CoA durch die Isomerase etwa zur Hälfte in Succinyl-CoA umgewandelt wird. Wie aus Tab.8 auf S.24 und aus S.95 hervorgeht, ist dies auch tatsächlich der Fall. Mit dem unfractionierten Extrakt wurden von 0.66 uMol Methylmalonyl-CoA 0.29, mit dem gereinigten Enzym von 0.66 uMol 0.32 uMol zu Succinyl-CoA isomerisiert. Diese Versuche waren ein erster Anhaltspunkt dafür, daß das Gleichgewicht der Reaktion weitgehend auf der Seite des Succinyl-CoA liegt.

Etwas anders sollte sich dagegen das durch enzymatische Äquilibrierung von ^{14}C -Propionat mit Methylmalonyl-CoA dargestellte ^{14}C -Methylmalonyl-CoA (S.21)

verhalten. Macht man die Annahme, daß bei dieser Transcarboxylierung nur eines der Diastereomeren des Methylmalonyl-CoA an der Reaktion teilnimmt, und zwar das gleiche, das sich zu Succinyl-CoA isomerisieren kann, dann sollte sich das ^{14}C -Methylmalonyl-CoA quantitativ in Succinyl-CoA umwandeln lassen. Aus dem oberen Teil der Kurven von Fig. 6 und 13 läßt sich entnehmen, daß von dem eingesetzten ^{14}C -Methylmalonyl-CoA höchstens die Hälfte zu ^{14}C -Succinyl-CoA abreagierte. Das elektrophoretisch einheitliche ^{14}C -Methylmalonyl-CoA wurde daher nochmal chromatographisch gereinigt (Fig. 24).

Tabelle 15 zeigt einen Versuch zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten mit einem chromatographisch gereinigten 2- ^{14}C -Methylmalonyl-CoA-Präparat. Die Thioester wurden dabei nach der Reaktion in die Hydroxamsäuren überführt. Diese wurden dann durch Chromatographie getrennt und die radioaktiven Stellen durch Messung im Streifen-Zähler gekennzeichnet. Die der Methylmalon- bzw. der Succinhydroxamsäure zukommenden Flecke wurden eluiert und ausgezählt. Es zeigte sich dabei, daß das Enzym noch beträchtliche Aktivität zur Deacylierung von Succinyl-CoA enthält (siehe auch Fig. 19). Wie man aus Tabelle 15 entnehmen kann, verminderte sich die Menge an ^{14}C -Succinyl-CoA in 20 Min. um 34%, d.h. in dieser Zeit wurden 34% des zunächst aus Methylmalonyl-CoA entstandenen Succinyl-CoA zu Succinat und CoA gespalten. In dem gleichen Zeitraum nahm die Radioaktivität im ^{14}C -Methylmalonyl-CoA nur um 17% ab. Man muß deshalb annehmen, daß ein Teil des ^{14}C -Methylmalonyl-CoA sich nicht mehr ins Gleichgewicht setzte. Der Wert der Gleichgewichtskonstanten nimmt folglich umso rascher zu, je schneller das Succinyl-CoA gespalten wird, weil die sich nicht mehr ins Gleichgewicht setzende Radioaktivität im ^{14}C -Methylmalonyl-CoA konstant bleibt. Addiert man in dem Versuch von Tabelle 15 das ^{14}C -Succinyl-CoA und das daraus gebildete ^{14}C -Succinat (die Flächen der radioaktiven Gipfel des ^{14}C -Succinyl-CoA und des ^{14}C -Succi-

Tabelle 15

Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Isomerisierungsreaktion ausgehend von 2-¹⁴C-Methylmalonyl-CoA

	Inkubations- zeit in Min. bei 25°C	Methylmalon- hydroxam- säure I.p.M.	Succin- hydroxam- säure I.p.M.	Gleich- gewichts- konstan- te
- Enzym	30	8742	244	
+ "	10	2263 (100%)	6151 (100%)	0.37
+ "	20	1896 (84%)	4699 (76%)	0.40
+ "	30	1883 (83%)	4035 (66%)	0.47

Ansätze: Histidinpuffer pH 6.2, 25 uMol; chromatographisch gereinigtes (S.94) 2-¹⁴C-Methylmalonyl-CoA (364 000 I.p.M./uMol), 0.083 uMol; Serumalbumin, 0.75 mg; Avidin, 0.39 E.; DMBC, 4×10^{-7} M; Isomerasepräparat, 0.138 E., spez.Akt. 3.2, Inkubationsvolumen 0.75 ml. Die Aufarbeitung wurde wie auf S.93 beschrieben, durchgeführt.

nats am Ende des Versuchs in Tabelle 15 zeigten etwa das gleiche Verhältnis wie in Fig.19 III!), so zeigt sich, daß mindestens 80% des eingesetzten ¹⁴C-Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA umgewandelt wurden. Abschließend läßt sich sagen, daß das Substrat ¹⁴C-Methylmalonyl-CoA nicht rein genug war, um eine Gleichgewichtsbestimmung damit durchzuführen.

Befriedigender verliefen Versuche, von der Succinyl-CoA-Seite zu einem Gleichgewichtswert zu kommen. Ersetzt man in dem in der Legende zu Tabelle 6 beschriebenen Test das dort als Substrat verwendete ¹⁴C-Methylmalonyl-CoA durch synthetisches 1,4-¹⁴C-Succinyl-CoA und führt nach der Reaktion die Oxydation mit KMnO₄ durch, so bleibt die Zahl der oxydationsstabilen Impulse in Abhängigkeit von der Enzymmenge konstant. Es wandelte sich also nicht genügend Succinyl-CoA in Methylmalonyl-CoA um, um von

diesem Test erfaßt zu werden. In Tabelle 16 wurde die gleiche Methodik wie in Tabelle 15 angewendet. Es ergab sich dabei ein Wert für $K_{25^{\circ}\text{C}}$ von 0.04.

Tabelle 16

Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Isomerisierungsreaktion ausgehend von 1,4- ^{14}C -Succinyl-CoA

	Inkubations- zeit in Min. bei 25°C	Methylmalon- hydroxam- säure	Succin- hydroxam- säure	Gleich- gewichts- konstante
		I.p.M.		
Experiment 1				
- Enzym	10	52	4542	
+ "	10	176	3114	0.057
Experiment 2				
- Enzym	30	109	17538	
+ "	5	495	17415	0.028
+ "	15	406	12631	0.032
+ "	30	424	11471	0.037
Mittel:				0.039

Ansätze: Histidinpuffer pH 6.2, 25 μMol ; 1,4- ^{14}C -Succinyl-CoA (549 000 I.p.M./ μMol), Exp.1 0.03 μMol , Exp.2 0.06 μMol ; Serumalbumin 0.75 mg; Avidin, 0.39 E.; DMBC, 4×10^{-7} M; Isomerasepräparat nach Hydroxylapatit 0.138 E., spez. Akt. 3.2. Inkubationsvolumen 0.75 ml. Die Aufarbeitung wurde wie auf S. 93 beschrieben, durchgeführt.

Die Fig. 19 (siehe S.55) zeigt die chromatographische Aufarbeitung der Inkubationsansätze von Tabelle 16 Exp. 2. Ein Vergleich von Teil II und Teil III mit dem kein Ferment enthaltenden Teil I läßt deutlich die zu-



Fig.19: Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Isomerisierungsreaktion.

Wie auf S.93 näher beschrieben, wurde 1,4- ^{14}C -Succinyl-CoA mit gereinigter Isomerase inkubiert und danach die Hydroxamsäuren chromatographiert. Teil I zeigt einen Testansatz ohne Zusatz von Enzym (30 Min. 25°C). Teil II und III zeigt Versuche mit Enzym nach 5 bzw. 30 Min. bei 25°C.

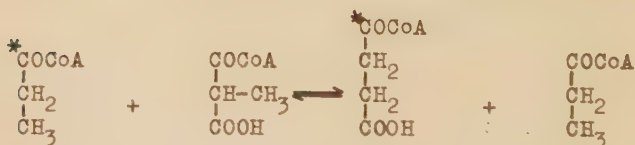
nehmende enzymatische Spaltung von ^{14}C -Succinyl-CoA erkennen.

Alle beschriebenen Versuche sprechen dafür, daß das Gleichgewicht der Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA weitgehend auf der Seite des Succinyl-CoA liegt. Aus Tabelle 16 geht die Reversibilität der Reaktion und ein ungefährer Gleichgewichtswert von 0.04

hervor. Dieser Wert hält sich in der Mitte zwischen den Angaben anderer Autoren. PHARES et al. bestimmten die Konstante zu 0.01 - 0.02 ⁵⁹⁾ und STJERNHOLM et al. ⁵¹⁾ gelangten zu einem Wert von 0.095. Die Versuche von STJERNHOLM et al. dürften recht zuverlässig sein, weil sie mit einem keine Deacylaseaktivität mehr enthaltenden Isomerasepräparat durchgeführt wurden und von beiden Seiten der Reaktionsgleichung zu demselben Wert führten. Die dort verwendete Methodik ist der hier beschriebenen überlegen, weil sie auf der enzymatischen Bestimmung der Reaktionspartner in einem zusammengesetzten optischen Test beruht.

IV. Versuche zum Mechanismus der Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA

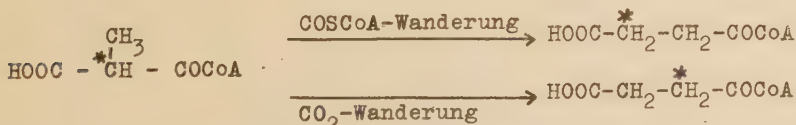
In der Einleitung (S.5) wurde erwähnt, daß die Umlagerung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA von OCHOA und Mitarb. in Extrakten aus tierischem Gewebe aufgefunden wurde. Versuche, dem Mechanismus der Isomerisierung auf die Spur zu kommen (BECK et al. ⁶⁰⁾), führten zu der Theorie, daß die Reaktion keine echte Umlagerung, sondern eine Transcarboxylierung sei.



Bei diesem Mechanismus sollte Propionyl-CoA eine katalytische Rolle spielen. Methylmalonyl-CoA sollte Propionyl-CoA in β -Stellung unter Bildung von Succinyl-

CoA und einer neuen Molekel Propionyl-CoA carboxylieren. Den experimentellen Beweis zu dieser Theorie sah man darin, daß ein angeblich Carboxylase-freies (siehe S.5) Isomerasepräparat aus Methylmalonyl-CoA in Gegenwart von ^{14}C -Propionyl-CoA radioaktives Succinat lieferte. Weder der experimentelle Befund noch die daraus gezogenen Schlußfolgerungen sind durch Versuche von STADTMAN et al.⁴³⁾ bestätigt worden. Die Carboxylierung des β -C-Atoms des Propionyl-CoA erscheint schon deshalb wenig plausibel, weil die β -Stellung nicht wie die α -Stellung durch ein nachbarständiges Thiolestercarboxyl aktiviert ist. Da auch die tierische Propionyl-CoA-Carboxylase ein Biotin-Enzym ist⁶¹⁾, wäre in dem geschilderten Transcarboxylierungsmechanismus ein Biotin-Enzym als Vehikel des CO_2 sehr wahrscheinlich. Aus Tabelle 8 geht jedoch hervor, daß die Isomerase durch Avidin nicht gehemmt wird. Man kann somit das Experiment von BECK et al. nur so erklären, daß das dort verwendete Enzym durch eine Verunreinigung an Carboxylase noch fähig war, ^{14}C -Propionyl-CoA und Methylmalonyl-CoA auszutauschen. Das dabei gebildete ^{14}C -Methylmalonyl-CoA isomerisierte sich dann zu ^{14}C -Succinyl-CoA.

Nimmt man an, daß es sich bei der Isomerisierung um eine echte Umlagerung handelt, dann ergibt sich die Frage, ob bei der Reaktion die freie oder die durch Co-enzym A veresterte Carboxylgruppe wandert. Dieses Problem wurde von EGGERER et al.⁶²⁾ durch die Versuche mit 2- ^{14}C -Methylmalonyl-CoA gelöst.



Mit diesem Substrat würde eine Verschiebung des Thiolestercarboxyls zu 3- ^{14}C -Succinyl-CoA, eine Wanderung des freien Carboxyls hingegen zu 2- ^{14}C -Succinyl-CoA führen.

Das bei der Reaktion entstandene ^{14}C -Succinyl-CoA wurde mit NH_3 zur ^{14}C -Succinamidsäure umgesetzt. Der Abbau der Succinamidsäure zeigte dann, daß sich 80% der Radioaktivität im β -C-Atom befanden. Damit war bewiesen, daß bei der Umlagerung die mit Coenzym A veresterte Carboxylgruppe verschoben wird. Durch diesen Befund wird die Umlagerung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA auch der in BARKER's Arbeitskreis untersuchten Isomerisierung von Glutaminsäure zu Methylasparaginsäure etwas ähnlicher. Diese Reaktion kommt auch nicht durch die Verschiebung einer Carboxylgruppe, sondern durch die Wanderung der $-\text{CHNH}_2-\text{COO}^-$ -Gruppe zustande (vgl. Formulierung auf S. 3).

Obwohl man durch diesen Versuch, der inzwischen durch SWICK⁶³⁾ bestätigt wurde, darüber unterrichtet war, welches C-Atom bei der Isomerisierung wandert, blieb doch der eigentliche Mechanismus der Reaktion vor allem hinsichtlich der Beteiligung des B_{12} -Coenzyms rätselhaft. Die Fig.20 versucht klar zu machen, welche prinzipiellen Möglichkeiten für den Mechanismus in Frage kommen, wenn man von einem intermolekularen Gang der Reaktion absieht.

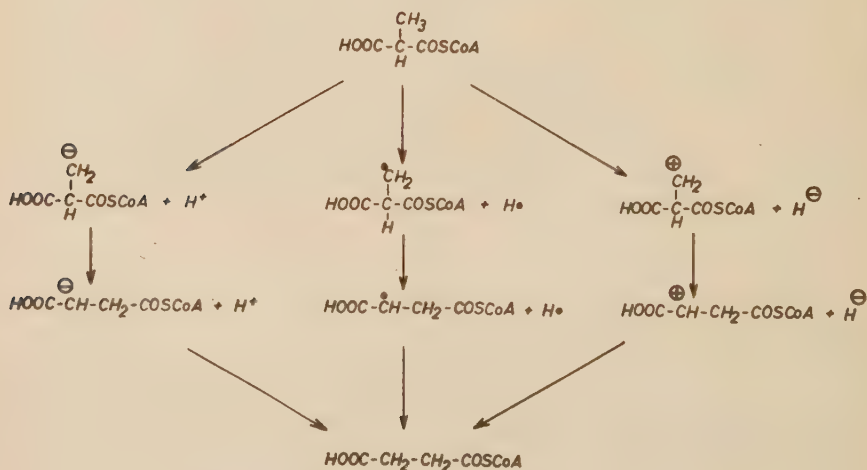


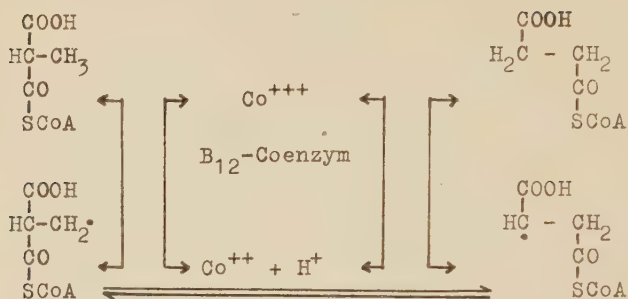
Fig.20: Mögliche Mechanismen der Isomerisierungsreaktion bei einer Wanderung des Thiolester-carboxyls

Im linken Teil von Fig.20 ist ein Mechanismus beschrieben, der nach einleitender Abspaltung eines Protons von der Methylgruppe des Methylmalonyl-CoA durch eine kationische Wanderung des Thiolestercarboxyls zum Reaktionsprodukt Succinyl-CoA führt. Dieser Weg ist wenig wahrscheinlich, weil das Thiolestercarboxyl nicht wie eine normale Carboxylgruppe durch Resonanz stabilisiert ist. Deshalb wird das Thiolestercarboxyl auf die benachbarte C-C-Bindung einen Elektronensog ausüben, und die Tendenz, als Kation zu wandern, wird gering sein.

Die gleichen Gründe, die gegen eine kationische Wanderung des Thiolestercarboxyls sprechen, kann man als vorteilhaft für eine anionische Verschiebung ansehen. Bei dem im rechten Teil der Fig.20 angedeuteten Weg, der zunächst die Abspaltung eines Hydridions von der Methylgruppe notwendig machen würde, hätte die als Anion wandernde COSCoA-Gruppe die Möglichkeit, sich intermediär durch die Aufrichtung der Doppelbindung zu stabilisieren. Die beiden beschriebenen Mechanismen kann man natürlich auch so formulieren, daß sich zunächst das Thiolestercarboxyl als Kation oder Anion ablöst, und in dem zurückbleibenden Teilchen ein Proton bzw. ein Hydridion wandert.

Im mittleren Teil von Fig.20 wird schließlich ein radikalischer Mechanismus diskutiert. Obwohl bei diesem Weg die Abspaltung eines H-Atoms wegen der hohen Abtrennungsenergie ein besonderes Problem mit sich bringt, wurde er doch von EGGERER et al.⁶²⁾ als wahrscheinlich vorgeschlagen. Das Einleuchtende dieses Vorschlags lag darin, daß sich hier die Möglichkeit bot, über die Beteiligung des Coenzym an der Reaktion etwas auszusagen. EGGERER et al. stellten sich vor, daß das einleitend gebildete H-Atom sein Elektron an das dreiwertige Kobalt des Coenzym unter Reduktion desselben zur zweiwertigen Stufe abgeben könnte. Das H-Atom würde dabei

intermediär in ein Proton übergehen.



Die Reaktion des Cobalts als Elektronenacceptor ist aber sehr fragwürdig geworden, nachdem die Zweiwertigkeit des Kobalts im Coenzym¹⁴⁾ feststeht. Ein zweiwertiges Kobalt in einem Durchdringungskomplex dürfte viel eher die Tendenz haben, als Reduktionsmittel, d.h. als Elektronendonator zu wirken.

Bei dem im linken Teil von Fig.20 beschriebenen Mechanismus, vielleicht aber auch bei einem radikalischen Verlauf der Reaktion, würde ein Proton als Zwischenprodukt auftreten. Falls dieses Proton in freier Form gebildet würde, müßte es sich mit Tritiumionen vermischen, wenn man die Reaktion in tritiiertem Wasser ablaufen läßt. Zwei solche Experimente zeigt Tabelle 17 (siehe S.61). Dabei wurde folgendermaßen verfahren: Methylmalonyl-CoA wurde in Succinatpuffer pH 6.25 mit Enzym in tritiumhaltigem Wasser inkubiert. Nach der Reaktion wurde das gebildete Succinyl-CoA durch Erhitzen auf 100°C gespalten. Da sich die Wasserstoffatome der Carboxylgruppen des Succinats mit den Tritiumionen ins Gleichgewicht setzen, wurde das Produkt mehrmals unter Zusatz von H_2O gefriergetrocknet. Nach Zugabe von Träger-Succinat wurde dann bis zur Schmelzpunktskonstanz umkristallisiert. Anschließend wurde die

Radioaktivität im Scintillationszähler bestimmt. Sowohl aus Exp. 1 als auch aus Exp. 2 in Tabelle 17 geht hervor, daß die Proben ohne Enzym nicht radioaktiv waren, d.h. die Carboxylgruppen und die CH_2 -Gruppen des Succinats waren frei von Tritiumatomen. Die Proben mit Enzym dagegen waren radioaktiv, d.h. hier war Tritium in die CH-Bindungen des Succinats eingebaut worden.

Tabelle 17

Die Umlagerung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA in Gegenwart von tritiumhaltigem Wasser

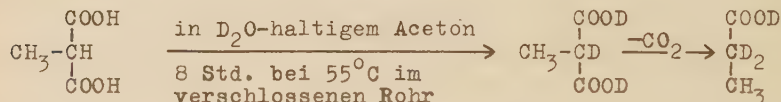
	Vorinkubationszeit in Min. vor Enzym- zugabe	Succinat I.p.M./mg
Experiment 1		
- Enzym	-	2
+ "	-	144
Experiment 2		
- Enzym	60	0
+ "	-	156
+ "	10	124
+ "	20	128
+ "	30	108
+ "	60	140

Ansätze: K-Succinat-Puffer pH 6.25, 120 μMol ; Methylmalonyl-CoA, 2 μMol ; Serumalbumin, 1.5 mg; Avidin, 0.39 E.; DMBC, 4×10^{-7} M; tritiiertes Wasser (200 mC/ml), 0.1 ml; Methylmalonyl-CoA-Isomerase, 4.1 E. spez. Akt. 3.2; V = 1.5 ml. Die Proben wurden mit Enzym 10 Min. bei 37°C inkubiert. Die Vorinkubation ohne Enzym wurde ebenfalls bei 37°C durchgeführt. Aufarbeitung siehe S.95.

Im Experiment 2 wurde das eingesetzte Methylmalonyl-CoA vor der Enzymzugabe mit dem tritium-haltigen Reaktionsgemisch vorinkubiert. Wie man sieht, stieg die Radioaktivität im Succinat nicht mit der Vorinkubationszeit an. Aus dem höchsten Wert der Tab.17 (156 I.p.M./mg Bernsteinsäure) läßt sich berechnen (siehe S. 96), daß dieser Betrag einem Einbau von 0.83 Atomen Tritium pro Atom an isomerisiertem Methylmalonyl-CoA entspricht.

Leider lassen sich aus diesen Versuchen keine eindeutigen Rückschlüsse auf den Mechanismus der Reaktion ziehen. Methylmalonyl-CoA enthält am tertiären C-Atom einen durch die Nachbargruppen aktivierten Wasserstoff. Es besteht kein Zweifel darüber, daß dieses Wasserstoffatom prinzipiell zum Austausch befähigt ist.

HÖLEMANN und CLUSIUS⁶⁴⁾ stellten Deuteropropionsäure aus Methylmalonsäure auf folgendem Wege dar:

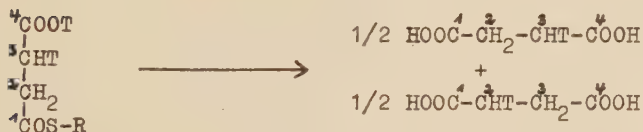
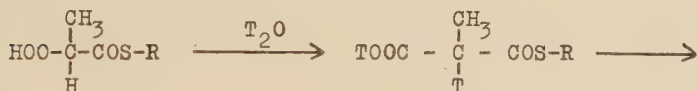


Es zeigte sich dabei, daß unter den angegebenen Bedingungen auch das aktivierte H-Atom am C₂ quantitativ ausgetauscht wurde. Dieser Versuch gibt natürlich keinerlei Anhaltspunkte dafür, ob der Austausch nicht auch schon nach viel kürzerer Zeit und unter milderer Bedingungen vollständig gewesen wäre.

Wenn auch die Versuchsdurchführung in Tabelle 17 weniger drastisch ist, so gibt es doch zwei Umstände, die hier zu einer Erhöhung der Tendenz, ein Proton am C₂ abzuspalten, beitragen dürften. Erstens arbeiteten HÖLEMANN et al. in saurer Lösung, die Proben in Tabelle 17 dagegen wurden bei pH 6.25 inkubiert. Die Tendenz zur Abspaltung eines Protons am C₂ des Methylmalonyl-CoA wird aber sicher mit steigendem pH-Wert größer. Zum andern

ist dieses Proton durch die nachbarständige Thiolestergruppierung stärker aktiviert als in der Methylmalonsäure.

Nach dem Gesagten liegt die Vermutung nahe, daß der Tritiumeinbau durch eine rasche nichtenzymatische Äquilibrierung des THO mit der CH-Bindung des Methylmalonyl-CoA zustande kommt. Nach der Isomerisierung entsteht daraus dann ein tritium-haltiges Succinat, dessen kohlenstoffgebundene Wasserstoffatome nicht mehr austauschen können.



Vorversuche zeigten, daß man den Austausch des Protons am C-Atom 2 der Methylmalonsäure durch kernmagnetische Resonanzuntersuchung verfolgen kann. Diese Experimente waren aber beim Abschluß der hier vorliegenden Arbeit noch nicht beendet.

Nimmt man an, daß der beobachtete Einbau von rund einem Tritiumatom in die Bernsteinsäure durch den geschilderten nichtenzymatischen Austausch verursacht wird, dann müßte man daraus schließen, daß bei der Umlagerung selbst kein Tritium eingebaut wird. Dies würde dann jedoch für den im rechten Teil von Fig.20 beschriebenen Mechanismus sprechen, denn ein Hydridion würde sich nicht mit den Tritiumionen ins Gleichgewicht setzen.

Es sei schließlich noch darauf hingewiesen, daß

Reaktion nicht wesentlich beeinflußt. Dieser Versuch sprach also gegen Acrylsäure als Zwischenprodukt der Reaktion.

Tabelle 18

Versuch zur Hemmung der Isomerisierungsreaktion durch Acrylsäure

				¹⁴ C-Succinat
				I.p.M.
vollständiges System				635
"	"	+ 0.06 uMol K-Acrylat		626
"	"	+ 0.24 uMol	"	644
"	"	+ 0.60 uMol	"	560
"	"	+ 2.40 uMol	"	559

vollständiges System: K-Succinatpuffer pH 6.25, 20 uMol; 2-¹⁴C-Methylmalonyl-CoA (177 000 I.p.M./uMol), 0.017 uMol; Avidin, 0.065 E.; Serumalbumin, 0.25 mg; DMBC, 4×10^{-7} M; Enzym, 0.635×10^{-5} E., spez.Akt. 1.9. Aufarbeitung sonst wie auf S.85 beschrieben.

Zur weiteren Beweisführung wurde der Frage nachgegangen, ob die Acrylsäure während der Reaktion radioaktiv geworden war. Dazu wurde die Säure aus dem Reaktionsgemisch nach Zugabe von Träger durch Wasserdampfdestillation abgetrennt und in Acrylanilid übergeführt. Tabelle 19 (siehe S.66) zeigt das Ergebnis des Versuchs. Die Ausbeute bei der Darstellung des Anilids war so schlecht, daß das Derivat nicht bis zur Schmelzpunktreinheit umkristallisiert werden konnte. Die in den Proben noch nachweisbaren Impulse liegen jenseits der exakten Meßbarkeit. Man kann aber immerhin erkennen, daß die spezifische Aktivität nach der 2. Kristallisation abnahm. Die noch nachweisbare Radioaktivität dürfte auf

Tabelle 19

Die Isomerisierungsreaktion in Gegenwart von
Acrylsäure

	<u>Acrylanilid</u>	
	I.p.M./mg	
	1.Kristallisation	2.Kristallisation
- Enzym	5.2	2.4
+ "	4.7	2.9

Ansätze: K-Succinatpuffer pH 6.25, 400 μ Mol; 2- 14 C-Methylmalonyl-CoA (277 000 I.p.M./ μ Mol), 0.362 μ Mol; Serumalbumin, 5 mg; Avidin 1.3 E; DMBC, 4×10^{-7} M; Na-Acrylat, 48 μ Mol; Enzym 0.059 E. spez.Akt. 3.6. V = 5 ml; Inkubation: 20 Min. bei 37°C. Aufarbeitung siehe S. 97.

eine Verunreinigung des Acrylanilids durch 14 C-Propionyl-anilid zurückzuführen sein. Das während der Reaktion nicht umgesetzte 14 C-Methylmalonyl-CoA wird vermutlich bei der Wasserdampfdestillation teilweise verseift, und die sich dabei bildende 2- 14 C-Methylmalonsäure decarboxyliert zu 2- 14 C-Propionsäure. Nimmt man an, daß sich das 14 C-Methylmalonyl-CoA zur Hälfte zu 14 C-Succinyl-CoA isomerisierte, so wäre unter den Bedingungen des Versuchs in Tabelle 19 ein Einbau von 0.3% in die Acrylsäure noch eben nachweisbar gewesen. Dieses Experiment schließt also ebenfalls die Möglichkeit aus, daß Acrylsäure in freier Form und in größeren Mengen als Zwischenprodukt der Umlagerung auftritt.

In einer kürzlich erschienenen Mitteilung berichtete SWICK⁶³⁾ über ähnliche Versuche. SWICK setzte dem Reaktionsgemisch 14 C-Acrylsäure zu, konnte aber keinen Einbau in Succinat bei der Isomerisierung von unmarkiertem Methylmalonyl-CoA feststellen.

EXPERIMENTELLER TEIL

=====

I. Die verwendeten Substrate und die Beschreibung allgemeiner Methoden

Dimethylbenzimidazol- und Benzimidazol- B_{12} -Coenzym verdanken wir Dr.H.A.BARKER. Adenin- B_{12} -Coenzym wurde von Dr.E.R.STADTMAN nach Lit.10 dargestellt. Avidin wurde nach WOOLLEY et al.⁶⁷⁾ bereitet. Für die Bestimmung des Avidins danke ich Fräul.E.RINGELMANN. Nach LAKIM et al.⁶⁸⁾ definiert man 1 Einheit Avidin als die Menge, die 1 μ Biotin zu binden vermag. Li_2 -Acetyl-phosphat wurde nach Lit.69 dargestellt. 1- und 2- ^{14}C -Propionyl-CoA⁶²⁾, N,S-Disuccinyl-cysteamin³⁹⁾ und S-Acetyl-N-succinyl-cysteamin³⁹⁾ überließ mir freundlicherweise Dr.H.EGGERER. Capryl-cysteamin wurde nach Lit.39 und Benzoyl-pantethein nach Lit.70 gewonnen.

Cytochrom C, Coenzym A (C.F.Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim), Rinderserumalbumin (Behringwerke, Marburg/Lahn), Salmiridinsulfat (Hormonchemie, München), Aktivkohle (Carbo activatus pro analysi, Methylenblautiter 10-11, E.Merck AG, Darmstadt), tritiiertes Wasser (Atomic Energy Research Establishment, Harwell, Dilcot, Berks, England), 2- ^{14}C -Propionsäure und 1,4- ^{14}C -Bernsteinsäure (Volk-Radiochemical Company) waren Handelsprodukte.

Für die Radioaktivitätsmessungen stand das Strahlungsmeßgerät FH 49, der Radiopapierchromatograph FH 452 mit Linienschreiber PC 120 und Parallelschalter von Friesseke & Hoepfner, Erlangen-Bruck, zur Verfügung. Die Bestimmung der Radioaktivität nicht flüchtiger Sub-

stanzen wurde auf Aluminiumplättchen (3 cm Durchmesser) durchgeführt. Dazu wurden die wäßrigen Lösungen der Proben auf die Schälchen aufgetragen und bei 100°C auf dem Dampfbad zur Trockne gebracht. Daran schloß sich die Messung im Gasdurchflußzähler an. Um reproduzierbare Werte zu erhalten, wurde darauf geachtet, daß die Substanz stets gleichmäßig über die gleiche Fläche verteilt war.

Protein wurde in rohen Extrakten nach BEISENHERZ et al.⁷¹⁾ mit der Biuretmethode, in reineren Enzymfraktionen hingegen optisch nach KALCKAR⁷²⁾ bestimmt. Der Nukleinsäuregehalt der Enzymlösungen wurde ebenfalls optisch gemessen⁷³⁾. Papierelektrophoresen wurden auf dem von Th. WIELAND und G. PFLEIDERER entwickelten Hochspannungserographen, Modell "Frankfurt", Fa. Hormuth und Vetter, Heidelberg, durchgeführt.

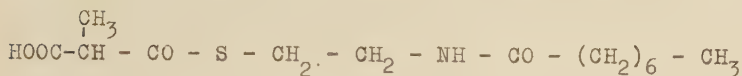
II. Die Darstellung von Monothioleestern der Methylmalonsäure

1. Methylmalonsäure

Methylmalonsäure wurde durch Verseifung von Methylmalonsäure-diäthylester⁷⁴⁾ dargestellt. 17.4 (100 mmol) Methylmalonsäurediäthylester wurden mit 15 g KOH in 50 ml Wasser 3 Std. unter Rückfluß erhitzt. Dann wurde mit 5 n HCl kräftig angesäuert und über Nacht mit Äther perforiert. Der Äther wurde im Vakuum abgezogen, das verbleibende Rohprodukt getrocknet und aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 9.7 g = 82% d.Th.,
Smp. 131 - 133°C unter Zer-
setzung

2. S-Methylmalonyl-N-capryl-cysteamin (MG. 303.4)



a) Darstellung

In drei Kölbchen gibt man je 295 mg Methylmalonsäure (3 x 2.5 mMol), 2 ml absoluten Äther und 0.18 ml Thionylchlorid. Man setzt drei durch P₂O₅-Rohre verschlossene Rückflußkühler auf und erhitzt die Lösungen 6 Std. zum schwachen Sieden. Aus dem nur wenig gefärbten Reaktionsprodukt wird der Äther und etwas unverbrauchtes Thionylchlorid im Vakuum abgezogen. Meistens bildet sich dabei eine Trübung, die aus Methylmalonsäure besteht. Der in den Kölbchen verbleibende Rückstand wird mit je 510 mg (3 x 2.5 mMol) Caprylcysteamin bei 0°C zu einer homogenen Masse verrieben. Man hält die Proben dann 2 Std. im Vakuumexsiccator über KOH (Ölpumpenvakuum). Der ölige Inhalt der Kölbchen wird in zusammen 60 ml Essigester gelöst. Zur Abtrennung des unverbrauchten Caprylcysteamins, der Methylmalonsäure und ihres Dithiolesters schüttelte man die Lösung zunächst 2 x mit 20 ml H₂O, dann 4 x mit 20 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung aus. Der Essigester und das Waschwasser werden verworfen. Die Bikarbonatlösung wird 2 x mit 30 ml Äther ausgeschüttelt. Auf Grund einer Thiolesterbestimmung (S. 71) ergab sich, daß die NaHCO₃-Lösung 1.75 bis 2.4 mMol Methylmalonsäure-thiolester enthielt. Durch Ansäuern der Lösung erhält man ein halbfestes, schmieriges Rohprodukt, das über P₂O₅ scharf getrocknet wird. Die Kristallisation gelang aus Essigester/Petroläther. Mit Aufarbeitung der Mutterlaugen, die man zweckmäßig nach der ersten Kristallisation mit etwas Aktivkohle behandelt, gelangt man zu 300 mg (13% d.Th.) Substanz (farblose Nadeln) vom Schmelzpunkt 70-72°C.

Analyse⁺):

3.576 mg Subst.	7.270 mg CO ₂	2.660 mg H ₂ O	
3.174 mg Subst.	0.133 ccm N ₂ (25°C, 723 mm)		
C ₁₄ H ₂₅ O ₄ NS	C%	H%	N%
Ber.:	55.42	8.30	4.62
Gef.:	55.48	8.32	4.56

Äquivalentgewichtsbestimmung:

30.3 mg Substanz werden in H₂O/Äthanol gelöst und mit n/10 NaOH gegen Phenolphthalein als Indikator titriert.
Verbrauch an Lauge: 0.99 ml

Äquivalentgewicht: Ber. 303
Gef. 300

b) Eigenschaften

Löslichkeit: Methylmalonyl-capryl-cysteamin löst sich schwer in Wasser, ist unlöslich in Petroläther und leicht löslich in Alkohol, Essigester und Aceton.

Chromatographische Eigenschaften: Die Verbindung ist chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich. Sie wurde in Methylmalon-hydroxamsäure übergeführt⁷⁵⁾ und liefert mit H₂O-gesättigtem Butanol als Fließmittel einen mit FeCl₃-Reagenz anfärbbaren Fleck (R_F = 0.51, Whatman 1, absteigend). Zum gleichen Ergebnis führte die elektrophoretische Untersuchung (Whatman 1, Puffer: 100 ml Pyridin, 10 ml Eisessig und 890 ml H₂O, Spannung 45-50 V/cm, Laufzeit 1 Std.): Sowohl der Thiolester⁺⁺⁾

⁺⁾ Für die Durchführung der Analyse danke ich Herrn Schulz, Mikroanalytisches Laboratorium, Institut für organische Chemie der Universität München.

⁺⁺⁾ Thiolester wurden kenntlich gemacht⁷⁶⁾, indem man das Papier mit einer konzentrierten Lösung von Nitroprussidnatrium in gesättigter Ammonsulfatlösung besprühte, und das Chromatogramm dann über eine Schale mit konzentriertem Ammoniak hielt. Merkaptane zeigen dabei eine momentan, Thiolester eine verzögert auftretende Rotfärbung.

selbst als auch die daraus gebildete Monohydroxamsäure zeigten ein einheitliches Verhalten. Als Vergleichssubstanz zur Charakterisierung wurde Methylmalonsäurediäthylester mit Hydroxylamin umgesetzt, wobei ein Gemisch aus Mono- und Dihydroxamsäure entsteht.

Spektrum: 2.967 mg Substanz werden in 100 ml 0.1 M K-Phosphat-puffer pH 7.0 gelöst. Man nimmt das Spektrum unter Verwendung einer Quarzküvette mit 1 cm Lichtweg auf. Nach Umrechnung auf eine Konzentration von 1M/L ergibt sich die in Fig.1 gezeichnete Kurve mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $4450 \pm 3\%$ bei einer Wellenlänge von 236 mu.

Hydroxylaminolyse: Normalerweise wurde die Thiolesterbestimmung wie folgt durchgeführt⁷⁷): 1 ml Thiolesterlösung mit 0-5 uMol werden mit 0.5 ml Hydroxylaminreagenz (Mischung gleicher Volumina 4 M Hydroxylaminhydrochloridlösung und 3.5 M NaOH) 15 Min. bei Zimmertemp. inkubiert. Dann gibt man 1.5 ml FeCl_3 -Stopperlösung zu und schüttelt das ausgefallene Capryl-cysteamin mit 1 ml Äther aus. Die Extinktion wird bei 546 mu im Photometer Eppendorf abgelesen. Der Anstieg war in einem Bereich von 0 - 5 uMol linear.

$$\Delta E_{546 \text{ mu}} = 0.120/\text{uMol}, \quad d = 1 \text{ cm}.$$

Um diesen Test für die auf S. 24 beschriebenen Versuche empfindlicher zu gestalten, wurde die Anordnung etwas abgeändert: 0.5 ml Thiolesterlösung mit 0.05 - 1 uMol (für die in Fig.21 gezeigte Eichkurve wurde eine Lösung von 50 uMol Methylmalonyl-capryl-cysteamin in 10 ml 0.1 M Maleinsäurepuffer pH 6.5 verwendet) läßt man wie oben angegeben mit 0.2 ml Hydroxylaminlösung reagieren, versetzt mit 0.7 ml Stopperlösung, schüttelt mit 0.3 ml Äther aus und liest die Extinktion in einer schmalen Küvette mit 2 cm Lichtweg im Photometer Eppendorf bei 546 mu ab. Fig.21 (siehe S.72) zeigt die unter diesen Bedingungen erhaltene Kurve.

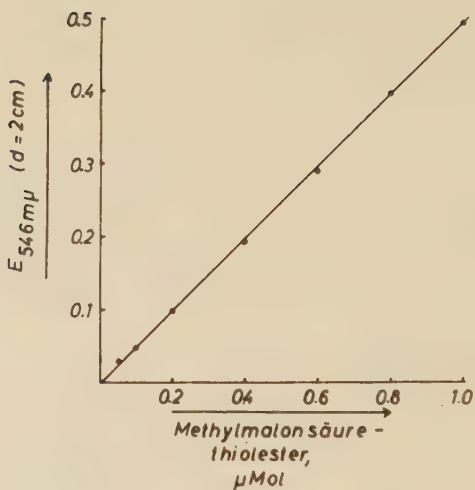


Fig.21: Eichkurve zur Bestimmung von Methylmalonsäure-thioleestern als Hydroxamsäure.

Bedingungen siehe Text.

Ammonolyse: Die Ammonolyse wurde mit der "verzögerten Nitroprussidreaktion" nach LYNEN⁷⁸⁾ durchgeführt.

Ansatz: 1 ml Thiolesterlösung mit 0 - 0,5 μMol
2 ml gesättigte Ammonsulfatlösung
0.3 ml 2%ige Nitroprussidnatriumlösung

Man liest die Leerextinktion bei 546 m μ ($d = 1 \text{ cm}$) im Photometer Eppendorf ab, gibt 0.3 ml konz. NH_3 zu und verfolgt die Kinetik der Farbentwicklung. Im linearen Teil der in Fig.22 (siehe S.73) wiedergegebenen Kurve wird der Scheitelwert nach etwa 15 Min. erreicht.

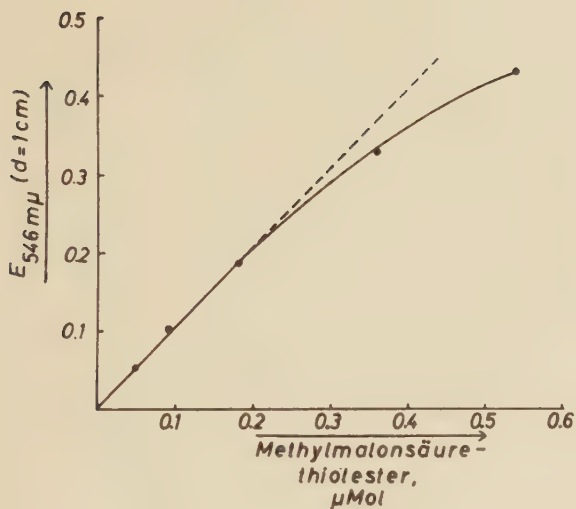


Fig.22: Bestimmung von Methylmalonsäure-thioestern mit der "verzögerten Nitroprussidreaktion".

Alkalische Verseifung: Der Verlauf der Hydrolyse wurde photometrisch verfolgt, wie dies an Thioleestern von NODA, KUBY und LARDY⁷⁹⁾ und von EGGERER³⁹⁾ durchgeführt wurde.

Für die Esterverseifung gilt die allgemeine Gleichung:

$$\frac{dx}{dt} = k(a-x)(b-x) \quad (1)$$

Ist der Reaktionspartner b in großem Überschuß vorhanden, dann vereinfacht sich (1) zu:

$$\text{bei } b \gg a \quad \frac{dx}{dt} = k'(a-x) \quad \text{wobei } k' = kb \quad (2)$$

Ist die jeweilige Konzentration des Thiolesters x ,

so wird

$$-\frac{dx}{dt} = k'x \quad \text{und} \quad k't = \ln \frac{a}{x} \quad (3)$$

Die Anfangskonzentration a ist proportional der Absorption des Thiolesters

$$a = \frac{E_a}{\epsilon_T} \quad (4)$$

E_a bedeutet die gemessene Anfangskonzentration, ϵ_T den molaren Extinktionskoeffizienten.

Die Messung wurde bei einer Wellenlänge von 236 mμ durchgeführt. Bei dieser Wellenlänge beträgt der molare Extinktionskoeffizient des bei der Reaktion freierwerden Mercaptans etwa 3% des Wertes für den Thiolester. Zur Zeit t setzt sich somit die Extinktion aus der des noch vorhandenen Thiolesters und der des gebildeten Mercaptans zusammen.

$$E_t = x \epsilon_T + (a - x) \epsilon_M \quad (5)$$

ϵ_M = molarer Extinktionskoeffizient des Mercaptans

$a \epsilon_M = E_e$ = die Absorption des Mercaptans nach vollständiger Verseifung des Thiolesters

$$x = \frac{E_t - a \epsilon_M}{\epsilon_T - \epsilon_M}$$

Setzt man (4) und (5) in (3) ein, so ergibt sich:

$$k't = \ln \frac{\epsilon_T - \epsilon_M}{\epsilon_T} \cdot \frac{E_a}{E_t - E_e} \quad (6)$$

wobei $\frac{\epsilon_T - \epsilon_M}{\epsilon_T} \approx 0.97$

Die endgültige Beziehung lautet somit:

$$k't = \ln 0.97 \frac{E_a}{E_t - E_e} \quad (7)$$

Zur Zeit t_0 werden 7 ml einer wäßrigen Lösung von Methylmalonyl-capryl-cysteamin mit etwa 1 $\mu\text{Mol/ml}$ (Temp. 15°C) mit 7 ml 0.2 M NaOH der gleichen Temperatur vereinigt. Man leitet einen Strom von N_2 an die Oberfläche der Lösung, um eine Oxydation des entstehenden Mercaptans möglichst auszuschließen. Man inkubiert bei 15°C . Je 1 ml des Verseifungsansatzes werden zur Zeit t in 1 ml Stopperlösung (0.5 ml 0.2 M K-Phosphatpuffer pH 7.0 + 0.5 ml 0.2 M HCl) gegeben. Man liest die Extinktion bei 236 μ in einer 0.5 cm Quarzküvette gegen die gleiche Lösung ohne Thiolester ab. E_a ermittelt man, indem man 0.5 ml der Thiolesterlösung mit einer Mischung aus 0.5 ml 0.2 M NaOH und 1 ml Stopperlösung vereinigt.

Tabelle 20 zeigt die bei der Verseifung erhaltenen Meßwerte. Trägt man $\log a/x$ gegen t auf, so ergibt sich

Tabelle 20

Alkalische Hydrolyse von Methylmalonyl-capryl-cysteamin

t (Min.)	$E_{236 \mu}$	$E_t - E_e$	$\frac{0.97E_a}{E_t - E_e}$	$\log \frac{0.97 E_a}{E_t - E_e}$	k'
0	0.620	0.601	1.00	0	
7	0.515	0.496	1.21	0.083	0.027
14	0.444	0.425	1.41	0.149	0.024
21	0.384	0.365	1.64	0.215	0.024
28	0.327	0.308	1.95	0.290	0.024
35	0.282	0.263	2.28	0.358	0.023
42	0.240	0.221	2.72	0.435	0.024
49	0.206	0.187	3.21	0.507	0.024
∞	0.019				
$E_a = 0.620$		$E_e = 0.019$			

die in Fig.23 gezeichnete Kurve. Bei einer Konzentration der Natronlauge von 0.1 M ist k'_{15} im Mittel $0.024 \text{ (L Mol}^{-1} \text{ Min}^{-1})$. Nach Gleichung (2) ergibt sich daraus für 1 N NaOH ein Wert für $k = 0.24 \text{ (L Mol}^{-1} \text{ Min}^{-1})$.

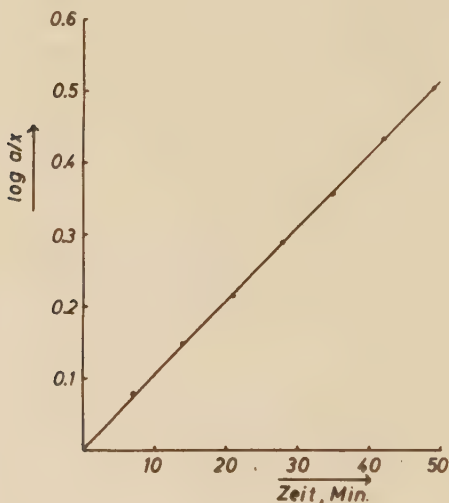


Fig.23: Bestimmung der Verseifungskonstanten von Methylmalonyl-capryl-cysteamin

3. Methylmalonyl-CoA

In ein Reagenzglas mit Schliff (NS 14.5) werden 10.5 mg CoASH (ca. 10 μMol) in 0.4 ml 1 M Tris-Puffer pH 7.0 und 0.6 ml H_2O gelöst. Dann gibt man 2 mg KBH_4 und 30.3 mg Methylmalonyl-capryl-cysteamin (100 μMol) zu und stellt den pH-Wert bei 0°C vorsichtig unter Umschütteln mit 5 N KOH auf 8 (Spezialindikatorpapier Merck,

pH 6.4 - 8.0) ein. Man läßt die Lösung zunächst 2 Std. bei Zimmertemp. stehen, wobei sie sich durch ausfallendes Capryl-cysteamin trübt. Danach perforiert man 3 Std. mit peroxydfreiem Äther. Man kühlt dann die Lösung mit Eis, säuert mit 2 N HCl an und perforiert weitere 2 Std. Nach Entfernen des Äthers neutralisiert man die klare Lösung mit 1 M KHCO_3 bis pH 6. In der Lösung liegt kein freies SH, d.h. kein unverestertes CoA, mehr vor. Die Ausbeute an Methylmalonyl-CoA (gemessen mit Thiolesterbestimmung als Hydroxamsäure) ist quantitativ.

Die Elektrophorese (Bedingungen wie auf S.70 für Methylmalonyl-capryl-cysteamin beschrieben) ergab einen mit Nitroprussidnatrium entwickelbaren Fleck. Das Methylmalonyl-CoA war frei von Methylmalonyl-capryl-cysteamin und wanderte schneller als dieses.

4. Methylmalonyl-pantethein

In einem Reagenzglas mit Schliff (NS 14.5) werden 7.6 mg Benzoyl-pantethein (20 μMol , Schmelzpunkt $113-116^\circ\text{C}$) in 0.6 ml M/2 KOH und 0.5 ml H_2O unter leichtem Erwärmen gelöst. Man läßt das Gemisch 30 Min. bei Zimmertemp. stehen, um die Verbindung vollständig zu Pantethein und Benzoessäure zu verseifen. Man gibt dann 0.4 ml Trispuffer pH 7.0, 30.3 mg Methylmalonyl-capryl-cysteamin (100 μMol) und 2 mg KBH_4 zu. Man stellt den pH-Wert wie bei Methylmalonyl-CoA beschrieben auf 8 ein. Man läßt die Lösung eine Std. bei Zimmertemp. stehen und perforiert dann 2 Std. mit peroxydfreiem Äther. Danach wird mit 2 N HCl angesäuert, wobei das überschüssige Methylmalonyl-capryl-cysteamin ausfällt. Man kühlt die wäßrige Phase mit Eis und perforiert so lange, bis die Trübung verschwunden ist und dann noch weitere 10 Min. Die Lösung wird mit 1 M KHCO_3 bis pH 6 neutralisiert.

Die Thiolesterbestimmung ergab 13.4 μMol (67%

d.Th.) Methylmalonylthiolester. Die Reinheit des entstandenen Methylmalonyl-pantetheins wurde auf zwei Arten untersucht: Überführt man das Produkt in die Hydroxamsäure, so liefert die Chromatographie mit H_2O -gesättigtem Butanol nur einen mit Methylmalon-hydroxamsäure identischen Fleck. Die Chromatographie des Thiolesters selbst in Di-n-butyläther/Ameisensäure (das Fließmittel bereitet man, indem man Di-n-butyl-äther mit Ameisensäure schüttelt und die obere Phase verwendet⁸⁰⁾) ergab ebenfalls nur einen Fleck, der weder mit Benzoyl-pantethein noch mit Methylmalonyl-capryl-cysteamin identisch war.

R_f -Werte in Di-n-butyläther/ $HCOOH$ (Whatman 1, aufsteigend)

Methylmalonyl-pantethein	0.08
Benzoyl-pantethein	0.37
Methylmalonyl-capryl-cysteamin	0.89

III. Die Darstellung der radioaktiven Substrate

1. $2-^{14}C$ -Methylmalonyl-CoA

Wie auf S. 21 ausgeführt wurde, läßt sich radioaktives Methylmalonyl-CoA durch enzymatische Äquilibrierung von ^{14}C -Propionyl-CoA mit unmarkiertem Methylmalonyl-CoA darstellen. Die theoretisch erreichbare spezifische Aktivität im Methylmalonyl-CoA hängt verständlicherweise von dem Verhältnis der eingesetzten Mengen von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA ab. Da Methylmalonyl-CoA am C_2 ein Asymmetriezentrum besitzt, stellt synthetisches Methylmalonyl-CoA ein Gemisch von zwei Diastereomeren dar, von denen nur eines enzymatisch aktiv ist. Bei der im folgenden beschriebenen Darstellung von $2-^{14}C$ -Methylmalonyl-CoA (in analoger Weise wurde aus $1-^{14}C$ -Propionyl-CoA

$1\text{-}^{14}\text{C}$ -Methylmalonyl-CoA bereitet) ist also das Verhältnis von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA etwa 1:3, d.h. bei vollständiger Äquilibrierung des Propionyl-CoA mit dem Methylmalonyl-CoA können 75% der Radioaktivität in das letztere übergehen.

19.1 μMol Methylmalonyl-CoA, 3.2 μMol $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Propionyl-CoA mit insgesamt 7.7×10^6 I.p.M., 160 μMol β , β -Dimethyl-glutaratpuffer pH 6.7 und 0.68 ml Enzymlösung (3.5 mg Protein/ml, Darstellung siehe S. 84) werden 1 Std. bei 37°C inkubiert. Das Endvolumen betrug 3.9 ml. Nach der Inkubation wird 3 Min. auf 100°C in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Durch Proben, die man wie in dem in Tabelle 6 beschriebenen Test aufarbeitet, kann man sich davon überzeugen, daß unter diesen Bedingungen der Austausch etwa 90% des theoretischen Wertes beträgt. Die Trennung des Methylmalonyl-CoA von dem Propionyl-CoA erreicht man durch Elektrophorese auf Whatman 1 -Papier in Pyridin/Acetat-Puffer (siehe S. 70). Man trägt dazu 0.1 - 0.2 ml der Reaktionslösung auf das mit Puffer getränkte und auf die Glasplatte des Pherographen gepresste Papier auf und schaltet den Strom sofort ein. Die Laufzeit ist 2 Std. bei 45-50 V/cm. Durch Auswertung im Radio-papierchromatographen legt man die radioaktiven Gipfel fest (siehe Fig. 2). Dann schneidet man die dem ^{14}C -Methylmalonyl-CoA zukommenden Stellen aus und eluiert sie mit Wasser. Die vereinigten Eluate gibt man zur Beseitigung des Pyridins bei 0°C durch eine Kationaustauschersäule (Säulendimensionen 11 x 1 cm, Dowex 50 H^+ -Form) und perforiert die Lösung dann mit peroxydfreiem Äther, um die Essigsäure zu entfernen (man kühlt dabei die wäßrige Lösung mit Eis). Schließlich engt man die Lösung im Rotationsverdampfer ein und neutralisiert mit 1 M KHCO_3 bis pH 6.0. Die Ausbeute wurde mit dem auf S. 72 beschriebenen "verzögerten Nitroprussidtest" bestimmt. Die Lösung enthielt 9.67 μMol ^{14}C -Methylmalonyl-CoA (51% d.Th.). Da insgesamt 2.67×10^6 I.p.M. eingebaut wurden, ist die

spezifische Aktivität 0.276×10^6 I.p.M./ μ Mol. Bezogen auf ein Diastereomeres ergibt sich daraus, daß 91% der theoretisch möglichen Äquilibrierung erreicht wurden.

Wie aus Fig.2 hervorgeht, enthält das ^{14}C -Methylmalonyl-CoA kein Propionyl-CoA mehr. Führt man eine Probe davon in die Hydroxamsäure über, so findet man die Radioaktivität nach der Elektrophorese (Bedingungen siehe S.70) nur in dem mit authentischer Methylmalonhydroxamsäure identischen Fleck.

Das auf diese Weise bereitete ^{14}C -Methylmalonyl-CoA wurde, wenn nicht anders vermerkt, zu allen Versuchen verwendet. Wie auf S.52 näher ausgeführt, zeigte es sich jedoch bei den Versuchen zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Methylmalonyl-CoA-Isomerase, daß das Substrat nicht ganz einheitlich sein kann, da es sich vollständig in Succinyl-CoA umwandeln läßt. Auf S.94 ist daher ein chromatographisches Verfahren beschrieben, nach dem man ^{14}C -Methylmalonyl-CoA weiter reinigen kann.

2. 1,4- ^{14}C -Succinyl-CoA

Eichkurven zur Bestimmung von Succinyl-thiolesteren als Succinhydroxamsäure:

13.9 mg S,N-Disuccinyl-cysteamin (50 μ Mol) werden in 5 ml 0.1 M K-Phosphatpuffer pH 7.0 gelöst. In einem Bereich von 0.5 - 3 μ Mol gibt man 1 ml der den Thiolester enthaltenden Lösung zu 0.5 ml Hydroxylaminreagenz (S.71), wartet 15 Min., fügt dann 1.5 ml Stopperlösung (S.71) zu und liest die Extinktion in einer 1 cm Küvette bei 546 m μ im Photometer Eppendorf ab. Es ergab sich eine im Bereich von 0-3 μ Mol linear ansteigende Kurve.

$$\Delta E_{546 \text{ m}\mu} = 0.180/\mu\text{Mol Thiolester.}$$

1,4-¹⁴C-Succinyl-CoA: wurde über das Anhydrid⁸¹⁾ nach der Methode von SIMON und SHEMIN⁸²⁾ dargestellt.

2.55 mg 1,4-¹⁴C-Bernsteinsäure (21.6 μ Mol) mit insgesamt 9.67×10^6 I.p.M. wurden mit 1 ml Acetylchlorid 3 Std. am Rückflußkühler erhitzt. Darauf wurde das Acetylchlorid im Vakuum abgezogen, und die Reste davon durch dreimaliges Abziehen von 1 ml abs. Äther entfernt. Das entstandene Bernsteinsäureanhydrid wurde 2 Std. im Vakuum-exsiccator (Ölpumpe) über KOH gehalten.

Man versetzt das Bernsteinsäureanhydrid mit 22 mg CoASH (ca 21 μ Mol) und 1.9 ml H₂O. Dann stellt man das pH mit KHCO₃-Lösung auf 7-7.5 ein. Unter gelegentlichem Umschütteln läßt man die Lösung 30 Min. bei 0°C reagieren. Dann säuert man mit 2 N HCl auf pH 2-3 an und perforiert die Lösung 4 Std. mit peroxydfreiem Äther (Kühlung der wäßrigen Phase mit Eis). Wie durch einen Vorversuch gezeigt werden konnte, wird dabei das bei der Umsetzung teilweise entstehende Succinat praktisch quantitativ entfernt, der Thiolester ist unter diesen Bedingungen stabil. Die mit der auf S. 80 beschriebenen Methode gemessene Ausbeute an 1,4-¹⁴C-Succinyl-CoA betrug 15 μ Mol (70% d.Th. bezogen auf die eingesetzte Menge 1,4-¹⁴C-Bernsteinsäure). Die spezifische Aktivität wurde zu 0.549×10^6 I.p.M./ μ Mol bestimmt.

Wie elektrophoretisch und chromatographisch nachgewiesen werden konnte, enthält der so hergestellte Succinylthiolester noch Spuren von Acetyl-thiolester. Dieser rührt vermutlich daher, daß die Reaktion von Bernsteinsäure mit Acetylchlorid zu einem geringen Teil das gemischte Anhydrid ergibt, das dann durch das Thiol zu Bernsteinsäure und Acetyl-thiolester gespalten wird. Auf S. 23 wurde gezeigt, daß Succinylthiolester bei neutralem pH durch Erhitzen auf 100°C in 2 Min. hydrolysiert werden. Wie sich durch einen Versuch mit S-Acetyl-N-succinyl-cysteamin ergab, sind Acetylthiolester unter den gleichen Bedingungen stabil. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, daß das oben dargestellte 1,4-¹⁴C-

Succinyl-CoA noch etwa 1% Acetyl-thiolester enthält.

IV. Die Darstellung der Enzyme aus Propionsäurebakterien

1. Die Züchtung von Propionibakterium shermanii

Propionibakterium shermanii⁺) wurde vom Bakteriologischen Institut der Südd.Vers.-, und Forschungsanst. f. Milchwirtschaft in Weihenstephan, Post Freising, bezogen. Die Bakterien wurden in einem bei 120°C im Autoclaven sterilisierten Medium folgender Zusammensetzung gezüchtet³³⁾:

- | | |
|--------------------------|--|
| 1% "Bacto Yeast Extrakt" | (bezogen von den Difco
Laboratories inc., Detroit,
Michigan) |
| 1% "Bacto-Peptone" | (" ") |
| 2% Natriumlactat | (rein, wird als 50%ige Lösung
von der Riedel-de Haen
AG., Seelze-Hannover hergestellt) |

Anmerkung: Bei den zur Anreicherung der Methylmalonyl-CoA-Isomerase verwendeten Zellen, wurde das "Bacto Peptone" durch "Bacto Tryptone" ersetzt, doch konnte weder in der Aktivität noch im Anreicherungsangang ein Unterschied gegenüber den auf "Peptone" gezüchteten Zellen festgestellt werden.

Auf einem festen Nährboden kann man die Propionsäurebakterien züchten, wenn man dem Medium 1% Agar-Agar zusetzt. Sterile etwa zur Hälfte gefüllte Reagenzgläser beimpft man, indem man die Impfnadel in den Nährboden einsticht. Auf diese Weise werden schwach anaerobe Bedingungen geschaffen. Man überimpft die Kulturen alle 2-3 Monate und hebt sie bei 2°C im Kühlraum auf.

Zur Züchtung von größeren Mengen wurde das Inokulat

+) Herrn Dr. Kandler möchte ich für die Überlassung des Stammes herzlich danken.

schrittweise von 10 ml auf 18 L vergrößert. Das Volumen des Inokulats betrug 10-15% der zu beimpfenden Lösung. Die mit Zellstoff verschlossenen Flaschen wurden 36 Std. bei 30°C bebrütet. Da die Kulturen weder belüftet noch geschüttelt wurden, und somit die Zufuhr von Sauerstoff auf Diffusion reduziert war, herrschten während der Züchtung leidlich anaerobe Bedingungen.

Zum Zentrifugieren der Bakteriensuspensionen wurde eine Durchlaufzentrifuge mit 40 000 U./Min. (Carl Padberg, CEPA-Schnellzentrifuge) verwendet. Die feuchte Zellmasse wurde mit Wasser zu einem homogenen Brei verrieben und gefriergetrocknet.

Die Ausbeuten an Bakterien ersieht man aus folgender Zusammenstellung :

Medium in L	Feuchtzellen in g	Trockenzellen in g
144	626	-
18	80	25
120 ⁺)	335	110

2. Die Anreicherung des Enzymsystems zum Einbau von ^{14}C -Propionat in Succinat⁺⁺⁾

Der Aufschluß der Zellen: 10 ml einer wäßrigen Suspension von 7 g. Feuchtzellen von *Propionibacterium shermanii* (man kann ebensogut von Trockenzellen ausgehen und nehme dann 1.5 g Zellen und 30 ml Trispuffer), 20 ml 0.07 M Trispuffer pH 7.5 und 40 g Glasperlen (Nr.31/12) gibt man in eine 100 ml Duranglasflasche. Dann schüttelt man die Suspension 2 Min. bei einer Frequenz von 4000 Schwingungen/Min. im Zellhomogenisator nach MERKEN-SCHLAGER et al.⁵⁴⁾. Die Kühlung mit Kohlensäureschnee muß dabei so einreguliert werden, daß die Lösung weder einfriert noch über ca. 10°C erhitzt wird.

+) - unter Zusatz von "Bacto Tryptone" gezüchtet.

++) Wenn nicht eigens anders vermerkt, wurden alle Operationen mit Enzymen bei 0-3°C durchgeführt.

Aus insgesamt 24 derartigen Aufschlüssen wurden die Perlen durch Absaugen mit einer Glasfritte (Typ G1) entfernt. Die Flaschen und die Perlen wurden mit 80 ml 0.07 M Trispuffer pH 7.5 nachgewaschen. Das Filtrat wurde in 20 Min. bei 20 000 x g in einer Servallzentrifuge von den Zellbruchstücken befreit. Auf diese Weise erhält man 554 ml Rohextrakt mit 16.7 mg Protein/ml.

Protaminfällung: Unter kräftigem Rühren tropft man zu 550 ml Rohextrakt 106 ml 2%ige Salmiridinsulfatlösung. Der Niederschlag wird in 5 Min. bei 20 000 x g abgeschleudert und verworfen. Der Überstand hatte ein Volumen von 610 ml und enthielt 7.6 mg Protein/ml.

Kohleschritt: 605 ml dieses Überstands werden unter Rühren rasch mit 45.4 g Aktivkohle versetzt. Man rührt bis zur Homogenität und zentrifugiert 5 Min. bei 20 000 x g. Den Überstand kann man durch ein Faltenfilter geben, um Reste von Kohle daraus zu entfernen. Der nur noch schwach gefärbte und fast klare Überstand hatte ein Volumen von 445 ml und enthielt 3.5 mg Protein/ml.

Dialyse: Der Kohleüberstand läßt sich ohne Wirkungsverlust gegen Wasser dialysieren (15 ml Extrakt gegen 2 l H₂O, 4 Std.).

In der Tabelle 3 sind die bei dieser Anreicherung erhaltenen Ergebnisse zusammengefaßt, in der Legende dazu ist der Testansatz angegeben. Das hier beschriebene Enzympräparat wurde bei all den Versuchen verwendet, bei denen auf S. 84 verwiesen wird.

3. Enzymtest und Anreicherung der Methylmalonyl-CoA-Isomerase

Der Enzymtest

Der Test zur Umwandlung von Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA ist für die Anreicherung von besonderer Bedeutung und sei deshalb hier nochmals ausführlich beschrieben. Sein Prinzip wurde bereits auf S. 27 erörtert.

In ein 3 ml fassenden Reagenzglas pipettiert man nacheinander bei 0°C:

0.02 ml = 20 uMol 1 M K-Succinatpuffer pH 6.25 (da der pH-Wert des Puffers sich beim Verdünnen sehr stark ändert, bezieht sich diese Angabe auf denjenigen pH-Wert, der nach Verdünnung auf das Endvolumen erreicht wird. In unserem Fall ist also der pH-Wert nach 12.5-facher Verdünnung gleich 6.25)

0.05 ml = 0.017 uMol 1-¹⁴C- oder 2-¹⁴C-Methylmalonyl-CoA mit 2860 I.p.m.

0.05 ml = 0.25 mg Rinderserumalbumin (Lösung in H₂O)

0.01 ml = 0.065 Einh. Avidin (Lösung in 1%igem KCl)

0.04 ml = 1×10^{-4} uMol DMBC (dies entspricht einer Endkonzentration im Test von 4×10^{-7} M)

0.02 ml Enzym

Das Endvolumen war 0.25 ml. Es wurde 10 Min. bei 37°C inkubiert. Stets wurde eine Blindprobe ohne Enzym durchgeführt.

Zur Hydrolyse des entstandenen Succinyl-CoA stellt man die Proben sofort nach der Inkubation für 2 Min. in ein kochendes Wasserbad. Dann gibt man 0.05 ml Eisessig und 0.1 ml 0.1 M KMnO₄-Lösung zu und erhitzt 10 Min. auf 80°C. Man achte dabei darauf, daß das Permanganat nicht vollständig verbraucht wird. 0.2 ml der Lösung werden auf ein Aluminiumplättchen aufgetragen und bei 100°C auf dem Dampfbad zur Trockne gebracht. Zur Messung

der Radioaktivität siehe S.67.

Da man bei dem hier beschriebenen Test nicht bei maximaler Sättigung des Enzyms mit Substrat arbeitet (S.30), ist es wichtig, die Enzymmenge so zu wählen, daß die Umsätze noch im linearen Teil der Enzymabhängigkeit liegen (Fig.6). Es zeigte sich, daß ein Einbau in das Succinyl-CoA im Bereich von 0 - 500 I.p.M. unter den oben genannten Bedingungen gut reproduzierbare Ergebnisse liefert. Um das Enzym möglichst wenig zu verdünnen, wurden stets nur 0.02 ml (man gebe die Lösung durch Eintauchen der Pipette in das Testgemisch zu!) zum Test verwendet. Die Enzymlösungen mußten zum Test sehr stark verdünnt werden. Die im Anreicherungsang nach den jeweiligen Schritten angegebenen Verdünnungen sollen zeigen, wie stark man die Enzymlösung mit 0.01 M K-Phosphatpuffer pH 7.0 verdünnen muß, um mit 0.02 ml einen gut meßbaren Einbau im Test zu bekommen.

Definition der Enzymeinheit: Als Enzymeinheit wurde diejenige Enzymmenge definiert, die unter den Bedingungen des Tests 10^6 I.p.M. aus ^{14}C -Methylmalonyl-CoA in ^{14}C -Succinyl-CoA umzuwandeln vermag. Die spezifische Aktivität berechnet sich daraus als Einheiten/mg Protein. Da das eingesetzte ^{14}C -Methylmalonyl-CoA nicht rein ist (S.52) und sich deshalb nicht vollständig in Succinyl-CoA umwandeln läßt, und außerdem durch Salzeffekte die Radioaktivitätsmessungen nur von relativer Genauigkeit sind, ist es schwierig zu beurteilen, welchem Umsatz an Methylmalonyl-CoA eine Enzymeinheit entspricht. Nimmt man an, daß das ^{14}C -Methylmalonyl-CoA rein ist, und sonstige das Ergebnis verfälschende Einflüsse nicht bestehen, so kommt man bezogen auf ein Diastereomeres zu einem Umsatz von

$$\frac{10^6 \times 0.0085}{2860} = 2.97 \text{ uMol } ^{14}\text{C-Methylmalonyl-CoA/Enzymeinheit}$$

Die Proteinbestimmungen während des Anreicherungs-
ganges wurden bis zum Kohleschritt mit der Biuretmethode,
danach durch Messung der Absorption bei 280 und 260 mu
gemacht (siehe S. 68).

Die Anreicherung der Methylmalonyl-CoA-Isomerase

Rohextrakt: 30 g Trockenzellen von *Propionibacterium*
shermanii werden in 600 ml 0.07 M Trispuffer pH 7.5 ein-
gerührt. Je 31.5 g der homogenen Suspension werden mit
40 g Glasperlen (Nr.31/12) in einer 100 ml Duranglas-
flasche 2 Min. im Homogenisator nach MERKENSCHLAGER⁵⁴⁾
geschüttelt. Die Perlen werden wie auf S.84 beschrieben,
entfernt und mit 80 ml 0.07 M Trispuffer pH 7.5 gewa-
schen. Die Zelltrümmer werden in 20 Min. bei 20 000 x g
in einer Servallzentrifuge abgeschleudert.
Man erhält 575 ml eines leicht getrübbten, bräunlich ge-
färbten Extrakts. Verdünnung zum Test: 1:200.

Dialyse: Der Extrakt wird in einen Cellophanschlauch
gefüllt und über Nacht gegen fließendes 0.01 M K_2HPO_4
(Anordnung siehe ⁸³⁾) dialysiert. V = 575 ml. Verdünnung
zum Test: 1:200.

Abtrennung von Nukleinsäuren durch Manganchlorid⁸⁴⁾:
Zu 575 ml Dialysat gibt man unter Rühren tropfenweise aus
einer Pipette 28.8 ml 1 M Manganchloridlösung. Man rührt
30 Min. und zentrifugiert dann 10 Min. bei 35000 x g in
einer Servallzentrifuge. Der schwach getrübbte Überstand
hatte ein Volumen von 570 ml, der Niederschlag wurde ver-
worfen. Verdünnung zum Test: 1:200.

Abtrennung des DMBC durch Adsorption an Aktivkohle:
Der Kohleschritt gelingt nur dann mit guter Ausbeute an
Enzym, wenn er rasch durchgeführt wird. Die Adsorption
des DMBC dürfte praktisch momentan erfolgen. Daher wur-
den die 570 ml $MnCl_2$ -Überstand halbiert, und der Kohle-
schritt mit beiden Teilen hintereinander durchgeführt.
Unter kräftigem Rühren gibt man zu 286 ml Lösung 14.25 g

Aktivkohle (50 mg/ml) und rührt solange, bis eine homogene Suspension entstanden ist. Dann zentrifugiert man sofort 10 Min. bei 35 000 x g. Aus dem Überstand kann man geringe Reste von Kohle durch Abnutschen (Büchnertrichter) entfernen. Dabei soll die Lösung nicht zu stark schäumen. Insgesamt erhält man 475 ml Enzymlösung. Verdünnung zum Test: 1:200.

1. Ammonsulfatfraktionierung: Zu 475 ml Kohleüberstand gibt man unter Rühren in 45 Min. 166 g Ammonsulfat (0 - 58%) und rührt dann noch 15 Min. Der Niederschlag wird bei 78 000 x g in einer Spinco Ultrazentrifuge in 10 Min. abgeschleudert. Er ist braun-gelb gefärbt und enthält nur wenig Aktivität. Zu dem nur noch schwach gefärbten, klaren Überstand (520 ml) gibt man in 30 Min. 93 g Ammonsulfat (58-85%), rührt noch 15 Min. und zentrifugiert 20 Min. bei 78 000 x g. Der Überstand soll entweder klar oder nur noch ganz schwach trüb sein. Der rötliche Niederschlag wird in 30 ml 0.07 M Trispuffer pH 7.5 gelöst und über Nacht gegen 10 L 0.01 M Trispuffer pH 8.0 dialysiert. Verdünnung zum Test: 1:2000.

Abtrennung der restlichen Nukleinsäuren durch Protaminsulfat: Das Verhältnis der Extinktion der dialysierten Lösung bei 280 m μ zu der bei 260 m μ liegt meist bei 0.74. Dies entspricht einem Nukleinsäuregehalt von etwa 9%. Da dieser Wert für Säulenfraktionierungen noch etwas zu hoch liegt, wurden die Nukleinsäuren auf folgendem Wege praktisch quantitativ entfernt: In einen 50 ml fassenden Servall-Becher gibt man zu 34.5 ml der dialysierten Lösung unter Rühren sehr langsam insgesamt 11 ml einer 1%igen Salmiridinsulfatlösung. Man rührt noch 10 Min. und zentrifugiert anschließend so lange bei 35 000 x g, bis der Überstand klar ist. Das β -Verhältnis der Enzymlösung liegt dann bei 1.5. V = 45 ml. Verdünnung zum Test: 1:2000.

Anmerkung: In späteren Anreicherungen zeigte es sich, daß ein Überschuß an Protaminsulfat leicht dazu führt, daß

ein großer Teil des Enzyms bei diesem Schritt ausgefällt wird. Es empfiehlt sich daher, die angegebene Menge Protaminsulfat nicht auf einmal, sondern schrittweise zuzugeben. Man zentrifugiert dann jeweils zwischendurch und verfolgt im Überstand das β -Verhältnis. Zur weiteren Zugabe kann man den Niederschlag einfach resuspendieren. Aus dem Anstieg des β -Verhältnisses läßt sich dann leicht beurteilen, wieviel Protaminsulfat man noch zugeben muß, um eine quantitative Abtrennung der Nukleinsäuren zu erreichen. Vor allem verfähre man so, wenn das β -Verhältnis der Ausgangslösung schon ein anderes ist.

2. Ammonsulfatfällung: 45 ml des rot gefärbten Überstandes der Protaminsulfatfällung werden unter Rühren mit einer Mischung aus 5 ml 1 M K-äthylendiamin-tetraacetat-Lösung pH 7.0 und 10 ml 0.5 M K-Phosphatpuffer pH 6.5 versetzt. Der pH-Wert der Enzymlösung liegt dann bei 6.65. Zu 60 ml dieser Lösung gibt man unter Rühren in 30 Min. 19.5 g Ammonsulfat (0-55%). Man rührt noch 10 Min. und zentrifugiert anschließend 10 Min. bei 105 000 x g in der Spinco Ultrazentrifuge. Der Niederschlag soll gelblich, der klare Überstand hingegen rot gefärbt sein. Zu 68 ml Überstand gibt man in 10 Min. weitere 6.3 g Ammonsulfat (55-70%) und zentrifugiert nach 10 Min. wie zuvor. Der farblose, klare Überstand wird verworfen. Der rötliche Niederschlag, der die Hauptmenge des Enzyms enthält, wird in 6 ml 0.07 M Trispuffer pH 7.5 gelöst und über Nacht gegen 10 L 0.01 M Na-Phosphatpuffer (Mischung gleicher Teile von primärem und sekundärem Na-Phosphat) dialysiert. Das Volumen war nach der Dialyse 9.0 ml, das β -Verhältnis lag bei 1.55. Verdünnung zum Test: 1:4000.

Chromatographie an Hydroxylapatit: Hydroxylapatit wurde nach Lit.55 dargestellt. In eine Säule (2 cm Durchmesser) gibt man bei offenem Hahn soviel Gel, daß das Endvolumen 63 ccm beträgt. Die Säule wird über Nacht ge-

gen 0.01 M Na-Phosphatpuffer äquilibriert. Dieser und alle zur Elution des Proteins verwendeten Puffer wurden durch Mischen gleicher Teile von Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 hergestellt. Das pH der Lösungen liegt dann bei 6.9. Man belädt die Säule mit 8 ml der beim letzten Schritt erhaltenen Enzymlösung (311 mg). Das Verhältnis mg Protein/ccm Hydroxylapatit ist dann 5. Man montiert die Säule über einen Fraktionskollektor und entnimmt alle 19 Min. eine Fraktion mit ca 17 ml Lösung. Man eluiert nacheinander mit 0.01 M, 0.05 M und 0.1 M Na-Phosphatpuffer. Der Verlauf der Elution geht aus Fig.12 hervor. Die ersten beiden Gipfel enthielten keine Aktivität, dagegen war in dem dritten fast die gesamte auf die Säule aufgesetzte Isomeraseaktivität. Die Elution des aktiven Proteins kann man sehr leicht erkennen, da dabei die zunächst rot gefärbte Säule entfärbt wird. Die Fraktionen 4-9, 57-63, 64-77, 81-86, 87-92 und 93 -112 (siehe Fig.12) wurden vereinigt und getestet. Die Fraktionen 81-92 (Verdünnung zum Test: Fraktionen 81-86 1:400, 97-92 1:100) enthielten zusammen 85% der auf die Säule aufgesetzten Enzymaktivität.

In Tabelle 13 sind die bei der Anreicherung erhaltenen Ergebnisse zusammengestellt.

Die Konzentrierung der Proteinlösungen:

1. Methode: Die bei der Fraktionierung erhaltenen Enzymlösungen (die Fraktionen 81-86, Gesamtprotein 103 mg, spez.Akt. 4.9 und die Fraktionen 87-92, Gesamtprotein 17,6, spez.Akt. 6.3; siehe Fig.12 und Tabelle 13) wurden vereinigt. Zu 202 ml der Lösung gibt man in 1 Std. 140 g Ammonsulfat unter Rühren zu. Man rührt eine weitere Stunde und zentrifugiert dann 5 Min. bei 105 000 x g in der Spinco-Ultrazentrifuge. Der Niederschlag wird in 0.01 M K-Phosphatpuffer pH 7.0 gelöst, und die resultierende Lösung wird 5 Std. gegen 10 L 0.01 M Trispuffer pH 8.0 dialysiert. Die leuchtend rot gefärbte Enzymlösung hatte ein Volumen von 11.5 ml. Sie enthielt 8.6 mg Protein/ml

und hatte eine spez.Akt. von 4.2. Die Aktivität hatte also bei der Konzentrierung merklich abgenommen. Bei anderen Anreicherungen zeigte es sich, daß diese Abnahme der Aktivität bei der Konzentrierung mit festem Ammonsulfat auch dann eintrat, wenn statt des hier verwendeten Ammonsulfat purissimum ein eigens nochmal aus Trilon B-haltigem Wasser umkristallisiertes Präparat verwendet wurde.

2. Methode: Erfolgreicher verlief die Konzentrierung mit gesättigter Ammonsulfatlösung. Dazu versetzt man die aktive Proteinfraction nach der Chromatographie an Hydroxylapatit mit dem dreifachen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung (das Ammonsulfat wurde aus Trilon-B-haltiger Lösung umkristallisiert) unter kräftigem Rühren und zentrifugiert dann 10 Min. bei 78 000 x g. Der Niederschlag wird in 0.05 M Trispuffer pH 7.5 aufgenommen. Das Ergebnis dieser Methode ist in Tabelle 21 zusammengestellt.

Tabelle 21

Konzentrierung der Enzymlösung nach der Chromatographie an Hydroxylapatit mit gesättigter Ammonsulfatlösung

	Rohextrakt	Lösung nach Hydroxylapatit	Lösung nach Konzentrierung
Volumen in ml	295	117	2.45
mg Protein/ml	12.4	0.506	16.20
Gesamtprotein in mg	3660	59	40
Einheiten/ml	2.51	1.64	59
Gesamtaktivität	741	192	145
spez.Akt.	0.20	3.2	3.6
Ausbeute in %	100	26	20

Aufbewahrung der Isomerasepräparate: Das nach der Chromatographie an Hydroxylapatit mit Ammonsulfat konzentrierte Enzym läßt sich bei -15°C auch dann ohne wesentlichen Aktivitätsverlust aufbewahren, wenn man es zwischendurch öfters auftaut. Auch die verdünnte Lösung nach der Säulenfraktionierung läßt sich bei -15°C aufbewahren, wenn man das Enzym mit Rinderserumalbumin bis zu einer Endkonzentration von 5 mg/ml versetzt.

V. Versuche mit gereinigter Methylmalonyl-CoA-Isomerase

1. Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten

Bei den in Tabelle 15 und 16 beschriebenen Gleichgewichtsmessungen war es wesentlich, daß die in die Monohydroxamsäuren überführten Coenzym A -Derivate der Methylmalonsäure und der Bernsteinsäure in dem gleichen Verhältnis zur Chromatographie gelangten, in dem sie nach der Inkubation vorlagen.

Die die Chromatographie störenden Salze wurden mit Hilfe einer Kationaustauschersäule abgetrennt. Gibt man radioaktiv markierte Methylmalon- oder Succinhydroxamsäure durch eine Dowex 50-Säule, so findet man die Radioaktivität quantitativ im Eluat. Macht man das gleiche mit größeren Mengen unmarkierter Hydroxamsäuren und mißt vor der Säulenbehandlung und nachher die Färbung der FeCl_3 -Komplexe, so findet man die Methylmalonhydroxamsäure quantitativ wieder. Der Wert für die Succinhydroxamsäure liegt jedoch nach der Säulenbehandlung bis zu 50% unter dem zu erwartenden Betrag. Dieses Verschwinden von Succinhydroxamsäure in saurer Lösung ist auf die Cyclisierung zu N-Hydroxy-succinimid zurückzuführen.

Die Cyclisierung gibt sich im Spektrum dadurch zu erkennen, daß die Absorption des FeCl_3 -Komplexes der Succin-hydroxamsäure mit ihrem Maximum bei 500 m μ abnimmt, und ein neuer Gipfel bei 415 m μ auftritt. Die Bildung von N-Hydroxysuccinimid wurde von ERRERA⁸⁵⁾ beschrieben. Die Verbindung liefert mit FeCl_3 -Lösung eine Braunfärbung. Succinhydroxamsäure und N-Hydroxysuccinimid lassen sich elektrophoretisch voneinander trennen. Für die hier beschriebene Aufarbeitung spielt diese Umwandlung keine Rolle, weil unter den verwendeten Bedingungen der Chromatographie beide Verbindungen fast denselben R_F -Wert haben.

Die unter den Tab.15 und 16 angegebenen Ansätze wurden nach der Inkubation mit 0.03 ml 2 N HCl angesäuert, mit 0.1 ml Hydroxylaminreagenz (siehe S.71) versetzt und mit 1 M KHCO_3 auf pH 7-7.5 gebracht. Man läßt die Proben 15 Min. bei Raumtemperatur stehen, säuert dann mit 0.15 ml 2 N HCl an und gibt zu jedem Test je 2 μMol Succin-hydroxamsäure, Methylmalon-hydroxamsäure und Succinat. Nun läßt man die Lösungen bei 0°C durch Dowex 50-Säulen (0.7 x 6.5 cm, H^+ -Form) laufen und wäscht mit Wasser bis zur Neutralität des Eluats nach. Die Lösungen werden gefriergetrocknet und auf einem Bogen Schleicher & Schüll-Papier (SS 2043 b ausgewaschen) 25-30 Std. bei 0-2°C absteigend mit n-Butanol/ H_2O / HCOOH (20:4:1) als Fließmittel chromatographiert⁸⁶⁾. Dabei ergaben sich folgende R_F -Werte:

Methylmalon-hydroxamsäure	0.50
Succin-hydroxamsäure + N-Hydroxysuccinimid	0.39
Succinat	0.73

Nach der Chromatographie läßt man das in Streifen geschnittene Papier durch den Radiopapierchromatographen laufen, schneidet die radioaktiven Stellen aus und eluiert sie mit Wasser auf Aluminiumplättchen. Die Radio-

aktivität wurde dann im Gasdurchflußzähler gemessen.

Das in Tabelle 15 verwendete $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Methylmalonyl-CoA wurde durch Chromatographie gereinigt. Dazu wurde eine Probe elektrophoretisch einheitliches $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Methylmalonyl-CoA (Fig. 2) auf einen Bogen Whatman 3-Papier aufgetragen und über Nacht bei $0\text{-}2^{\circ}\text{C}$ aufsteigend mit einer Mischung von 96 ml 0.1 M Na-Acetat-Puffer pH 4.5 und 104 ml 96%igem Äthanol (STADTMAN⁸⁷) chromatographiert. Dabei ergaben sich zwei radioaktive Gipfel (Fig. 24).

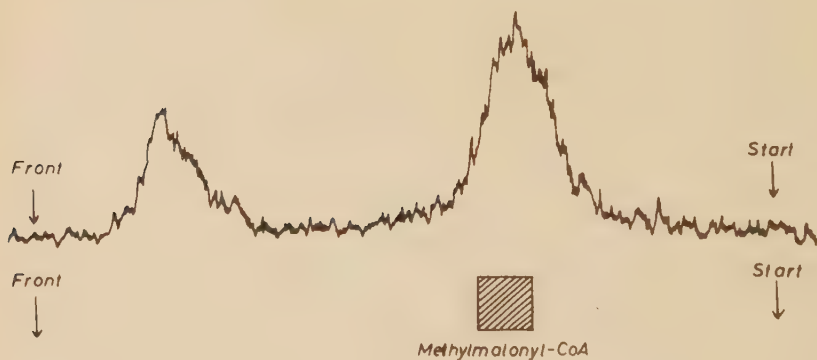


Fig. 24: Papierchromatographie von elektrophoretisch einheitlichem (siehe Fig. 2) $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Methylmalonyl-CoA

Der eine zeigte den gleichen R_F -Wert wie authentisches Methylmalonyl-CoA. Der andere Gipfel war enzymatisch inaktiv. Wie auf S. 53 näher ausgeführt, war aber auch das so gereinigte $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Methylmalonyl-CoA noch nicht rein genug für die Gleichgewichtsbestimmung.

2. Die Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA in tritiiertem Wasser

Die Aufarbeitung der in Tabelle 17 beschriebenen Ansätze wurde wie folgt durchgeführt: Nach der Inkubation bei 37°C wurden die Proben zur Hydrolyse des entstandenen Succinyl-CoA 2 Min. auf 100°C erhitzt und anschließend durch eine Kationaustauschersäule (0.7 x 6.5 cm, Dowex 50 H⁺-Form) gegeben. Die Eluate wurden gefriergetrocknet, 2 x mit H₂O versetzt und wiederum gefriergetrocknet. Dadurch sollte das in den Carboxylgruppen der Bernsteinsäure befindliche Tritium entfernt werden. Dann wurde zu allen Proben 100 mg Bernsteinsäure als Träger zugesetzt und aus Aceton/Petroläther umkristallisiert. Die nach der ersten Kristallisation erhaltenen Schmelzpunkte von 185°C und die spez. Aktivität blieben nach einer zweiten Kristallisation aus Wasser konstant. Die Bestimmung der Radioaktivität wurde mit einem Scintillationszähler (Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer, Modell M 314) durchgeführt. Dazu wurden etwa 2 mg Bernsteinsäure in ein 15 ml Meßgefäß eingewogen und 1 ml absolutes Methanol und 9 ml Scintillatorlösung (0.05 g 1,4-Bis-2-(5-phenyl-oxazolyl)-benzol und 2 g 2,5-Diphenyl-oxazol in 500 ml absolutem Toluol) zugegeben.

Zur Bestimmung der unter den Bedingungen von Tabelle 17 tatsächlich umgesetzten Menge an Methylmalonyl-CoA wurde in Anlehnung zu den Testansätzen in Tabelle 8 vorgefahren: K-Succinat-Puffer pH 6.25, 40 uMol; Methylmalonyl-CoA, 0.66 uMol; Serumalbumin, 0.5 mg; Avidin, 0.13 Einh., DMBC, 4×10^{-7} M und Methylmalonyl-CoA-Isomerase nach Hydroxylapatit, 1.4 Einh. spez. Akt. 3.2 wurden auf ein Endvolumen von 0,5 ml gebracht und 10 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben 2 Min. auf 100°C erhitzt und die verbliebene Menge an Thiolester als Methylmalon-hydroxamsäure (siehe S. 71) bestimmt. Als Blindprobe diente ein Test ohne Enzym. Es ergab sich,

daß von 0.66 uMol Methylmalonyl-CoA 0.32 uMol zu Succinyl-CoA umgesetzt worden waren. Unter den Bedingungen der Versuche in Tabelle 17 wurden also 0.96 uMol Methylmalonyl-CoA umgewandelt.

Die Ausbeute der im Scintillationszähler gemessenen Radioaktivität wurde mit Bernsteinsäure bestimmt. Dazu wurden 11.8 mg (100 uMol) Bernsteinsäure in 90 ml quarzdestilliertem Wasser mit 10 mC Tritium gelöst. Dann wurde das tritiumhaltige Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. Das zurückbleibende Succinat wurde auf die gleiche Weise im Scintillationszähler gemessen, wie die aus den Inkubationsansätzen isolierte Bernsteinsäure. Da sowohl H₂O als auch Bernsteinsäure je zwei austauschbare Protonen besitzen, ergibt sich folgende Beziehung: Die Messung ergab, daß unter den obigen Bedingungen 378 I.p.M./uMol in die Bernsteinsäure eingebaut wurden. Vernachlässigt man die Verdünnung des tritiumhaltigen Wassers durch die austauschenden Protonen der Bernsteinsäure, so ergibt sich, daß 2×10^{-3} uC/uMol im Wasser 378 I.p.M./uMol in der Bernsteinsäure entsprechen.

Aus Tabelle 17 kann man entnehmen, daß der höchste Wert der spez. Aktivität im Succinat 156 I.p.M./mg betrug. Da der Ansatz 114 mg Bernsteinsäure enthielt, wurden also insgesamt 17 800 I.p.M. eingebaut. Während der Isomerisierung von 0.96 uMol Methylmalonyl-CoA wurden also 17 800 I.p.M. inkorporiert. Zusammen mit der im Abschnitt vorher gegebenen Beziehung folgt daraus, daß während der Reaktion

$$\frac{18\,600 \times 2 \times 10^{-3}}{378} = 0.0985 \text{ uC Tritium/uMol Succinyl-CoA}$$

eingebaut wurden. Die spez. Akt. des Wassers in den Ansätzen in Tabelle 17 ist 0.238 uC/uMol H₂O. Beim Einbau von 2 Tritiumatomen müßte also das gebildete Succinyl-CoA ebenfalls eine spez. Aktivität von 0.238 uC/

μMol besitzen. Da während der Isomerisierung von 1 μMol Succinyl-CoA aber nur 0.0985 μC Tritium inkorporiert wurden, ergibt sich ein Einbau von 0.83 Tritiumatomen/Atom Succinyl-CoA

3. Der Versuch zum Nachweis von Acrylsäure als Zwischenprodukt der Isomerisierungsreaktion

Die in der Legende zu Tabelle 19 beschriebenen Proben wurden nach der Inkubation mit 1 mMol Acrylsäure (die Lösung wurde durch Wasserdampfdestillation frisch bereitet) versetzt und mit 0.4 ml 2N H_2SO_4 angesäuert. Die Ansätze wurden anschließend der Wasserdampfdestillation unterworfen. Etwa 40 ml Destillat wurden gesammelt und die Acrylsäure mit N/10 NaOH gegen Phenolrot als Indikator titriert. Die Ausbeute bei der Wasserdampfdestillation betrug 80%. Die Lösungen wurden dann im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Das zurückbleibende Na-Acrylat wurde in kleine Reagenzgläser übergeführt und über P_2O_5 scharf getrocknet. Zur Darstellung des Anilids wurden die Proben vorsichtig mit 0.2 ml Thionylchlorid versetzt⁸⁸⁾ und die zugeschmolzenen Gläschen 30 Min. auf 70-80°C erhitzt. Die abgekühlten Röhrchen wurden geöffnet und mit einer Mischung von 0.2 ml Anilin in 3 ml absolutem Benzol versetzt. Die Lösungen wurden 2 Min. auf dem Dampfbad erhitzt und dann nacheinander mit 0.2 ml H_2O , 0.5 ml 5%iger HCl, 1.5 ml 5%iger NaOH und 0.2 ml H_2O ausgeschüttelt. Nach Abziehen des Benzols verblieb ein kristalliner Rückstand. Das Anilid wurde 2 x aus H_2O umkristallisiert. Das Produkt schmolz nicht einheitlich: Ein Teil begann bereits bei 80°C zu schmelzen, der Hauptteil schmolz bei 95-100°C. Der Schmelzpunkt des reinen Acrylanilids liegt bei 104°C.

ZUSAMMENFASSUNG

=====

1.

Über das Monocarbonsäurechlorid wurde aus Methylmalonsäure kristallisiertes S-Methylmalonyl-N-caprylcysteamin dargestellt. Die Verbindung hat die für Thiolester typischen Eigenschaften. Durch Umacylierung von S-Methylmalonyl-N-caprylcysteamin mit CoA konnte Methylmalonyl-CoA bereitet werden.

2.

Extrakte aus Zellen von *Propionibacterium shermanii* katalysieren einen Austausch von ^{14}C -Propionat und Succinat. Wie Dr. E. R. STADTMAN⁴³⁾ nachwies, verliert der Extrakt diese Eigenschaft, wenn man ihn mit Aktivkohle behandelt. Die Aktivität kann durch Zusatz von Dimethylbenzimidazol- B_{12} -Coenzym wiederhergestellt werden.

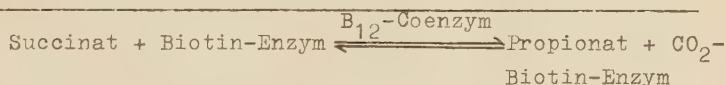
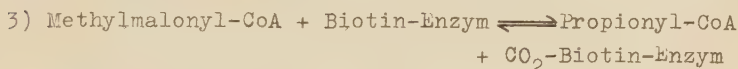
3.

Der Austausch von ^{14}C -Propionat mit Succinat wird durch Avidin gehemmt. Diese Hemmung tritt nicht ein, wenn man das Avidin mit Biotin vorbehandelt.

4.

Die Extrakte aus Propionsäurebakterien können die im tierischen Organismus schon länger bekannte Umlagerung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA durchführen. Diese Reaktion benötigt als Cofaktor ein B_{12} -Coenzym. Die Halbsättigungskonstanten des Enzyms für die bislang bekannten Coenzyme wurden bestimmt. Die Reaktion wird nicht durch Avidin gehemmt. Sie besitzt ein pH-Optimum von 6.3.

Da der Extrakt, wie Dr. H. EGGERER nachwies, ein durch Avidin hemmbares Enzym enthält, das ^{14}C -Propionyl-CoA mit Methylmalonyl-CoA austauscht, ergab sich für den Austausch von ^{14}C -Propionat und Succinat folgender Mechanismus:



Die Bedeutung dieser Reaktionen für die Bildung der Propionsäure in *Propionibakterium shermanii* wird diskutiert.

6.

Mit der Transcarboxylierungsreaktion zwischen Methylmalonyl-CoA und ^{14}C -Propionyl-CoA konnte ^{14}C -Methylmalonyl-CoA dargestellt werden.

7.

Das die Umlagerung von Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA katalysierende Enzym wurde aus *Propionibakterium shermanii* in 29%iger Ausbeute 16-fach angereichert. Das gereinigte Enzym kann nicht mehr ^{14}C -Propionat mit Succinat austauschen und ist nahezu frei von Methylmalonyl-CoA-Propionyl-CoA-Transcarboxylase. Es verhielt sich einheitlich in der Ultrazentrifuge und bei der elektrophoretischen Untersuchung. Die Proteinlösung des angereicherten Enzyms enthielt noch Spuren von B_{12} -Coenzym. Während der Anreicherung wurde die aktive Proteinfraktion stets von einer roten Farbe begleitet. Aus dem Spektrum

dieser roten Färbung im sichtbaren Bereich ergab sich, daß es sich dabei vermutlich um die lichtinaktivierte Form des B_{12} -Coenzym handelt. Weder das lichtinaktivierte Dimethylbenzimidazol- B_{12} -Coenzym noch Vitamin B_{12} vermögen das Apoferment zu reaktivieren.

8.

Versuche zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Isomerisierungsreaktion zeigten, daß die Reaktion reversibel ist. Das Gleichgewicht liegt weitgehend auf der Succinyl-CoA-Seite. Ausgehend von synthetischem 1,4- ^{14}C -Succinyl-CoA ergab sich ein Verhältnis von Methylmalonyl-CoA/Succinyl-CoA von 0.04 bei 25°C. Wegen der Unreinheit des enzymatisch gewonnenen ^{14}C -Methylmalonyl-CoA war eine Gleichgewichtsbestimmung von dieser Seite nicht möglich.

9.

Wie EGGERER et al.⁶²⁾ nachwiesen, kommt die Umlagerung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA durch die Verschiebung der mit Coenzym A veresterten Carboxylgruppe zustande. Die sich daraus für den Mechanismus der Reaktion ergebenden Konsequenzen werden diskutiert.

10.

Läßt man die Reaktion in tritiiertem Wasser ablaufen, so werden bis zu 0.83 Mol Tritium pro Mol an umgesetzten Methylmalonyl-CoA in die CH-Bindungen des Succinyl-CoA eingebaut. Obwohl ein schlüssiger Beweis für die Erklärung dieses Tritiumeinbaus fehlt, wird angenommen, daß der Einbau nicht während der Isomerisierung selbst stattfindet, sondern auf eine rasche nichtenzymatische Äquilibrierung des aktivierten H-Atoms am C_2 des Methylmalonyl-CoA vor der Umlagerung zurückzuführen ist.

11.

Freie Acrylsäure tritt bei der Umlagerung nicht als Zwischenprodukt auf.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

=====

- 1) Rickes E.L., Brink N.G., Koninszy F.R., Wood T.R.
und Folkers K., Science 107, 396 (1948)
- 2) Smith E.L. und Parker L.F.J., Biochem.J., 43 ,
viii (1948)
- 3) Hodgkin D.C., Pickworth J., Robertson J.H., True-
blood K.N., Prosen R.J., und White J.G.,
Nature 176, 325 (1955)
- 4) Hodgkin D.C., Kamper J., Mackay M., Pickworth J.,
Trueblood K.N. und White J.G., Nature 178,
64 (1956)
- 5) Bonnett R., Cannon J.R., Johnson A.W., Sutherland I.,
Todd A.R. und Smith E.L., Nature 176, 328 (1955)
- 6) Kon S.K. und Pawelkiewicz J., Proceedings of the Fourth
International Congress of Biochemistry, Vienna
1958, Symposium XI Vitamin Metabolism S.115
- 7) Arnstein H.R.V., Proceedings of the Fourth, Inter-
national Congress of Biochemistry, Vienna 1958,
Symposium XI Vitamin Metabolism, S.286
- 8) Barker, H.A., Weissbach H. und Smyth R.D.,
Proc.Nat.Acad.Sci. 44, 1093 (1958)
- 9) Weissbach H., Toohey J. und Barker H.A.,
Proc.Nat.Acad.Sci. 45, 521 (1959)
- 10) Barker, H.A., Smyth R.D., Weissbach H., Munch-Petersen
A., Toohey J. I., Ladd J.N., Volcani B.E. und
Wilson R.M., J.Biol.Chem. 235, 181 (1960)
- 11) Barker H.A., Smyth R.D. Weissbach H., Toohey J.I.,
Ladd J.N. und Volcani B.E., J.Biol.Chem.
235, 480 (1960)
- 12) Weissbach H., Ladd J.N., Volcani B.E., Smyth R.D.
und Barker H.A., J.Biol.Chem.235, 1462 (1960)
- 13) Barker H.A., persönliche Mitteilung über E.R.Stadtman

- 14) Bernhauer K., Gaiser F., Müller O., Müller E. und
Günter F., Biochem.Z. 333, 560 (1961)
- 15) Toohy J.I. und Barker H.A., J.Biol.Chem. 236,
560 (1961)
- 16) Smith R.M. und Monty K.J., Biochem.Biophys.Res.
Comm. 1, 105 (1959)
- 17) Lardy H.A. und Peanasky R., Physiol.Rev. 33, 560(1953)
- 18) Flavin M. und Ochoa S., J.Biol.Chem. 229, 965 (1957)
- 19) Flavin M., Castro.Mendoza H. und Ochoa S.,
J.Biol.Chem. 229 , 981 (1957)
- 20) Beck W.S., Flavin M. und Ochoa S., J.Biol.Chem.
229, 997 (1957)
- 21) Lardy H.A. und Adler J., J.Biol.Chem. 219, 933 (1956)
- 22) Lynen F., Knappe J., Lorch E., Jütting G. und
Ringelmann E., Angew.Chemie 71, 481 (1959)
- 23) Van Niel, C.B., The propionic acid bacteria,
Haarlem 1928
- 24) Wood H.G. und Werkman C.H., Biochem.J. 32, 1262 (1938)
- 25) Wood H.G. und Werkman C.H., Biochem.J. 34, 7 und 129
(1940)
- 26) Wood H.G., Werkman C.H., Hemingway A. und Nier A.O.,
J.Biol.Chem. 135, 789 (1940) und 139, 365 (1941)
- 27) Johns A.T., Biochem. J. 42, ii (1948)
- 28) Johns A.T., J.Gen.Microbiol. 5, 337 (1951)
- 29) Delwiche E.A., J.Bacteriol. 56, 811 (1948)
- 30) Leaver F.W., Wood H.G. und Stjernholm R.,
J.Bacteriol. 70, 521 (1955)
- 31) Whiteley H.R., Proc.Nat.Acad.Sci. 39, 772 und 779
(1953)
- 32) Delwiche E.A., Phares E.F. und Carson S.F.,
Federation Proc. 12, 194 (1953) und 13, 198(1954)

- 33) Delwiche E.A., Phares E.F. und Carson S.F.,
J.Bacteriol. 71, 598 (1956)
- 34) Phares E.F., Delwiche E.A. und Carson S.F.,
J.Bacteriol. 71, 604 (1956)
- 35) Delwiche E.A., J.Bacteriol. 58, 395 (1949)
- 36) Chambers E.H. und Delwiche E.A.,
J.Bacteriol. 68, 131 (1954)
- 37) Trams E.G. und Brady R.O., J.Am.Chem.Soc. 82,
2972 (1960)
- 38) Eggerer H., unveröffentlichte Versuche
- 39) Eggerer H., Dissertation, Universität München 1957
- 40) Knappe J., Dissertation, Universität München 1957
- 41) Ingold Ch.J., J.Chem.Soc. 1931, 2170
- 42) Hückel W., Theor. Grundlagen der org.Chemie,
Leipzig 1957, Bd.II S.630
- 43) Stadtman E.R., Overath P., Eggerer H. und Lynen F.,
Biochem.Biophys.Res.Comm. 2, 1 (1960)
- 44) Wessman G.E. und Werkman C.H., Arch.Biochem.Bio-
physics 26, 214 (1950)
- 45) Wakil S.J., Titchener E.B. und Gibson D.M., Biochim.
Biophys.Acta 29, 225 (1958)
- 46) Flavin M., Ortiz P.J. und Ochoa S., Nature 176, 823
(1955)
- 47) Stadtman E.R., unveröffentlichte Versuche
- 48) Gurnani S., Mistry S.P. und Johnson B.G.,
Biochim.Biophys.Acta 38, 187 (1960)
- 49) Stern J.R. und Friedman D.L., Biochem.Biophys.
Res.Comm. 2, 82 (1960)
- 50) Lengyel P., Mazumder R. und Ochoa S.,
Proc.Nat.Acad.Sci. 46, 1312 (1960)

- 51) Stjernholm R. und Wood H.G., Proc.Nat.Acad.Sci.
47, 303 (1961)
- 52) Swick, R.W. und Wood H.G., Proc.Nat.Acad.Sci.
46, 28 (1960)
- 53) Wood H.G. und Stjernholm R., Proc.Nat.Acad.Sci.
47, 289 (1961)
- 54) Merckenschlager M., Schlossmann K. und Kurz W.,
Biochem. Z. 329, 332 (1957)
- 55) Tiselius A., Hjertén S. und Levin Ö.,
Arch.Biochem.Biophys. 65, 132 (1956)
- 56) Grassmann W. und Hannig K., Z.Physiol.Chem.290, 1 (1952)
- 57) Grassmann W. und Hannig K., Naturwiss.37, 496 (1950)
- 58) Wunderly Ch., Chimia 7, 145 (1953)
- 59) Phares E.F., Long M.V. und Carson S.F.,
Abstracts of the Am.Chem.Soc.September 1960 21 C
- 60) Beck W.S. und Ochoa S., J.Biol.Chem. 232, 931 (1958)
- 61) Kaziro Y., Leone E. und Ochoa S.,
Proc.Nat.Acad.Sci. 46, 1319 (1960)
- 62) Eggerer H., Stadtman E.R., Overath P. und Lynen F.,
Biochem.Z. 333, 1 (1960)
- 63) Swick R.W., Federation Proc.20, A 80 b (1961)
- 64) Hölemann P. und Clusius K., Chem.Ber.70, 819 (1937)
- 65) Abeles R.H., Lee Jr.H.A. und Brownstein A.M.,
Abstracts of the Am.Chem.Soc.September 1960, 22 C
- 66) Abeles R.H. und Lee Jr.H.A., J.Biol.Chem. 236 PC1 (1961)
- 67) Woolley D.W. und Longsworth L.G., J.Biol.Chem. 142,
285 (1942)
- 68) Eakin R.E., Snell E.E. und Williams R.J.
J.Biol.Chem. 140, 535 (1941)
- 69) Methods in Enzymology V.III, 229 New York 1957

- 70) Gruber W., Dissertation, Universität Frankfurt 1959
- 71) Beisenherz, G., Boltze H.J., Bücher Th., Czok R.,
Garbade K.H., Meyer-Arendt E. und Pfeleiderer G.,
Z.Naturforsch. 8b, 555 (1953)
- 72) Kalckar H.M., J.Biol.Chem. 167, 461 (1947)
- 73) Warburg O. und Christian W., Biochem.Z. 310, 384 (1942)
- 74) Organic Syntheses, ed. by A.H. Blatt, John Wiley & Sons,
Inc., London, S.272 und 279 (1943)
- 75) Stadtman E.R. und Barker H.A., J.Biol.Chem. 184 769 (1950)
- 76) Seubert W., Dissertation, Universität München 1955
- 77) Stadtman E.R. in Methods in Enzymology, Eds. S.P.
Colowick und N.O. Kaplan (New York Academic
Press) Vol. III, 938 (1957)
- 78) Lynen F., Ann.Chem. 574, 33 (1951)
- 79) Noda L.H., Kuby S.A. und Lardy H.A.,
J.Am.Chem.Soc. 75, 913 (1953)
- 80) Waldstätten von, L., Diplomarbeit Universität München
1956
- 81) Leffler M.T. und Adams R., J.Am.Chem.Soc. 58 1551 (1936)
- 82) Simon E.J. und Shemin D., J.Am.Chem.Soc. 75, 2520 (1953)
- 83) Lorch E., Dissertation, Universität München 1960
- 84) Korkes S., del Campillo A., Gunsalus I.C. und
Ochoa S., J.Biol.Chem. 193, 721 (1951)
- 85) Errera G., Gaz.Chim.Ital. 25 II, 25 (1895)
- 86) Graßl M., unveröffentlichte Versuche
- 87) Stadtman E.R., J.Biol.Chem. 196, 535 (1952)
- 88) Shriner R.L., Fuson R.C. und Curtin D.Y., The
Systematic Identification of Organic Compounds,
Fourth Edition, New York 1956, S.200 .

L e b e n s l a u f

Am 13. August 1935 wurde ich in Düsseldorf als Sohn des Kaufmanns Albert Overath und seiner Ehefrau Gerda, geb. Roessler geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit in Rückersdorf, Mittelfranken, besuchte ich zwei Jahre die höhere Schule in Königstein, Taunus, später die Oberrealschule in Hersbruck, Mittelfranken. Dort legte ich 1953 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1953/54 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität München. Im Wintersemester 1955/56 legte ich die Diplom-Vorprüfung, im Januar 1958 die Diplom-Hauptprüfung für Chemiker ab. Vom Juni 1958 bis zum Juli 1959 führte ich die Diplomarbeit über das Thema "Die Verbreitung der Enzyme des β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA-Cyclus" und anschließend die vorliegende Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr.F.Lynen aus.

